

## Диагностические возможности иммуноферментного сенсора при кандидозах

Н. И. Глушко<sup>1</sup>, Е. В. Халдеева<sup>1</sup>, Т. Г. Маланичева<sup>2</sup>, Е. В. Файзуллина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии;

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань

## Diagnostic Abilities of Enzyme Immunosensor for Candidosis

N. I. Glushko<sup>1</sup>, E. V. Khaldeeva<sup>1</sup>, T. G. Malanicheva<sup>2</sup>, E. V. Faizoullina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology,

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan

### Аннотация

В работе показаны диагностические возможности иммуноферментного сенсора при поверхностном, висцеральном и системном кандидозе. Это подтверждается обнаружением в сыворотке крови циркулирующего антигена *Candida albicans*, зависимостью его уровня от тяжести заболевания и площади поражения, корреляцией с данными микологического обследования с пораженных участков кожи и слизистых оболочек и положительной клинической и серологической динамикой после антимикотической терапии. Предложенный иммуноферментный сенсор является новым эффективным, высокочувствительным и экспрессным методом для определения антигенов патогенных грибов и удобен в практическом использовании.

### Ключевые слова

Антигены, *Candida albicans*, диагностика, иммуноферментный сенсор, кандидоз.

### Введение

В последние годы возрос интерес к разработке методов иммунологической диагностики грибковых заболеваний, позволяющих выявлять специфические грибковые антигены в сыворотке крови [1]. В то же время существующие методы диагностики, в том числе коммерческие наборы для определения маннопротеидных антигенов *C. albicans* методом латекс-агглютинации и твердофазного иммуноферментного теста дорогостоящие и трудоемкие. Исходя из этого, актуальным является разработка и внедрение высокочувствительных, селективных и экспрессных методов определения кандидозного антигена с помощью биосенсоров (биочипов), которые представляют собой аналитические устройства, включающие биологически чувствительный элемент, тесно связанный или интегрированный с фи-

### Summary

Diagnostic abilities of electrochemical enzyme immunosensor are demonstrated for chronic mucocutaneous, deep and disseminated candidosis. It is confirmed by determination of circulating *Candida albicans* antigen in serum, correlation of its concentration with severity of candidosis and results of mycological findings on skin and mucosa. Application of the immunosensor allows for evaluation of clinical and serological dynamics after antifungal therapy. Developed enzyme immunosensor is a new effective (fast, sensitive and specific) method for the antigen determination of pathogenic fungi. Implementation of enzyme immunosensors allows making clinical analysis more simple and less time consuming.

### Keywords

Antigen, *Candida albicans*, diagnostics, enzyme immunosensor, candidosis.

зическим преобразователем. Работа в этом направлении привела к появлению аналитических систем, основанных на иммунологических реакциях, для определения малых количеств гормонов, ферментов, вирусов, опухолевых и бактериальных антигенов. Такой вид биосенсоров, использующий в качестве биочувствительного элемента антитела (Ат) или комплементарно связывающиеся с ними антигены (Аг) или гаптены, получил название иммуносенсоров (ИС) [2, 3].

Объединение принципов вольтамперометрии с иммунологическими реакциями позволяет создать недорогие, высокочувствительные и селективные аналитические устройства — амперометрические иммуносенсоры (АИС). В них объединяются преимущества электродных процессов (высокая чувствительность, линейная зависимость сигнала от концентрации, селектив-

ность за счет работы при разных потенциалах) и высокая специфичность иммунологической реакции [4].

Интерес для клинических исследований представляют ИС для определения Аг патогенных грибов, вызывающих распространенные заболевания человека (кандидозы, микозы) и растений (фитофтороз). Разработаны амперометрические иммуноферментные сенсоры (ИФС) для определения Аг патогенных грибов *Candida albicans* и *Trichophyton rubrum*. Биочувствительная часть ИФС представляет собой совместно иммобилизованные специфичные Ат и бутирилхолинэстеразу. Пределы обнаружения составляют  $1 \times 10^{-16}$  М и  $1 \times 10^{-15}$  мг/мл для *Candida albicans* и *Trich. rubrum* соответственно. Принцип действия ИФС основан на образовании иммунного комплекса Аг–Ат на поверхности биочувствительной части сенсора. Образующийся иммунный комплекс играет роль эффектора иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ), не действуя на другие компоненты биоспецифического взаимодействия. В изученных условиях иммунный комплекс оказывал ингибирующее либо активирующее действие на ИХЭ [5, 6].

#### Методы и материалы исследования

Циркулирующий антиген *Candida albicans* в сыворотке крови определяли методом ИФС на осциллографическом полярографе ПО–5122 модель 03 и потенциостате ПИ 50–1.1, совмещенном с компьютером АМД–К5–120, с ячейкой, термостатированной при  $(25.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$  с помощью термостата ТС–50. Рабочими электродами служили ИФС на основе совместно иммобилизованных антител и холинэстеразы. В работе использовали маннопротеидный антиген *Candida albicans* и гипериммунную кроличью сыворотку полученную лабораторией по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Специфическая поликлональная антисыворотка получена методом ступенчатой иммунизации кроликов клеточной вакциной гриба по схеме предусматривающей внутривенное введение. Сыворотка прошла предварительную очистку и протестирована на наличие преципитирующих антител в реакции иммунодиффузии [7]. Применяли препарат бутирилхолинэстеразы (ХЭ), изготовленный Пермским НИИ вакцин и сывороток с активностью 110 АЕ/мг. В качестве субстрата ХЭ использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ). Разработанный амперометрический ИФС состоит из специфической мембраны (биочувствительной части) и детектирующего элемента (трансдьюсера) [5, 6]. Трансдьюсером ИФС служил стационарный ртутно–пленочный электрод с серебряной подложкой. Получение биочувствительной части ИФС (коллоксилиновой пленки) проводили по ранее разработанной методике [5]. Для использования биочувствительной части в процессе ИФА пленку предварительно помещали в 1% водный раствор бычьего сывороточного альбумина на 30 минут при комнатной температуре, чтобы предотвратить неспецифическое связывание и блокировать несвязавшиеся активные центры глутарового альдегида.

#### Методика определения антигенов в сыворотке крови

В мерную колбу на 5 мл вводили 0.5 мл стандартного раствора БТХИ концентрацией  $2 \times 10^{-2}$  моль/л, затем 0.05 мл сыворотки крови больного, доводили до метки боратным буферным раствором с рН  $9.05 \pm 0.05$ . Полученный раствор переносили в электрохимическую ячейку и помещали в него ИФС. Инкубировали при перемешивании в течение 15 минут. Кислород удаляли током аргона. Регистрировали вольтамперограмму в интервале потенциалов от  $-0.1$  до  $-0.9$  В ( $V=1\text{В/с}$ ;  $E_0 = -0.3$  В). Измеряли высоту катодного пика при потенциале  $E = -0.55\text{В}$ . Концентрацию антигенов определяли по градуировочным графикам. Для проведения контрольного опыта в качестве стандарта использовали пул сывороток крови 25 здоровых людей. Сыворотки крови сохранялись в замороженном состоянии при  $-10^\circ\text{C}$ .

Больным с кандидозами также проводили углубленное клиническое, параклиническое и культуральное микологическое обследования соскобов с пораженных участков кожи, ногтевых пластинок, слизистой оболочки полости носа, биоптатов со слизистой оболочки желудка и кишечника, мокроты, мочи общепринятыми методами [8].

Обследовано 203 пациента с различными клиническими формами кандидоз. Из них с системным кандидозом 15 больных, висцеральным кандидозом 103 человека, в том числе с кандидозом желудка (35), кандидозом кишечника (12), мочевыводящих путей (31), бронхолегочной системы (25). С поверхностным кандидозом наблюдалось 85 человек. Из них с атопическим дерматитом, осложненным кандидозной инфекцией — 29, с дерматомикозами и онихомикозами кандидозной этиологии — 40, с кандидозным риносинуситом — 16. Пациенты мужского пола составили 50,7%, женского — 49,3%. В возрасте от 3 до 15 лет — 39,4% больных, от 16 до 30 лет — 23,6%, от 30 до 50 лет — 20,7%, старше 50 — 16,3%.

#### Результаты исследования

Результаты проведенного исследования показали (табл. 1), что высокие концентрации циркулирующего антигена *Candida albicans* в сыворотке крови отмечались при системной кандидозе ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  мг/мл) и некоторых формах висцерального кандидоза, таких как бронхолегочной кандидоз и кандидоз кишечника ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  мг/мл), что связано с большой площадью поражения при данных процессах и высокой всасываемостью из-за обильного кровоснабжения. Имеется корреляция ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,05$ ) между тяжестью течения заболеваний и уровнем маннопротеинового антигена *Candida albicans*. Умеренный уровень антигенемии ( $10^{-6}$ – $10^{-7}$  мг/мл) выявлялся при хронических риносинуситах, ассоциированных с грибами рода *Candida*, а также при дерматомикозах и онихомикозах кандидозной этиологии. Низкие концентрации циркулирующего кандидозного антигена определялись при кандидозном поражении желудка и мочевыводящих путей ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  мг/мл).

**Таблица 1**  
**Уровень циркулирующего кандидозного антигена (ЦКА) в сыворотке крови больных различными формами кандидоза**

Нозологические формы	Уровень ЦКА (мг/мл)	Положительные данные микологического обследования
Атопический дерматит, осложненный кандидозной инфекцией (n=29)	$10^{-9}$ – $10^{-4}$	89,6%
Дерматомикозы, онихомикозы кандидозной этиологии (n=40)	$10^{-7}$ – $10^{-6}$	83,3%
Кандидоз желудка (n=35)	$10^{-9}$ – $10^{-8}$	91,4%
Кандидоз кишечника (n=12)	$10^{-5}$ – $10^{-4}$	100%
Кандидоз мочевыводящих путей (n=31)	$10^{-9}$ – $10^{-8}$	96,8%
Кандидозный риносинусит (n=16)	$10^{-7}$ – $10^{-6}$	81,2%
Бронхолегочной кандидоз (n=25)	$10^{-5}$ – $10^{-4}$	96,0%
Системный кандидоз (n=15)	$10^{-5}$ – $10^{-4}$	100%

**Таблица 2**  
**Уровень циркулирующего кандидозного антигена в сыворотке крови при атопическом дерматите у детей с кандидозной колонизацией кожи**

Уровень кандидозной антигенемии	Концентрация антигена (мг/мл)	Количество больных (n=29)
Высокий	$10^{-5}$ – $10^{-4}$	34,5%
Умеренный	$10^{-7}$ – $10^{-6}$	44,8%
Низкий	$10^{-9}$ – $10^{-8}$	13,8%
Отрицательный	$10^{-11}$ – $10^{-10}$	6,9%

При атопическом дерматите у детей, осложненном кандидозной инфекцией и имеющим рецидивирующее течение и резистентность к противоаллергической терапии концентрация антигена *Candida albicans* в сыворотке крови прямо зависела от площади поражения и составила от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  мг/мл. (табл 2). Так, высокий уровень кандидозного антигена в сыворотке крови выявлялся у 34,5% детей, имеющих диффузное поражение кожных покровов с включением в процесс конечностей, лица, шеи, туловища, паховых и ягодичных складок. Умеренный уровень кандидозного циркулирующего антигена отмечался у 44,8% детей с распространенным кожным процессом (площадь поражения более 5% площади кожи). Процесс не ограничивался локтевыми и подколенными сгибами, а распространялся на прилегающие участки конечностей, грудь и спину. Низкий уровень кандидозного антигена определялся у 13,8% пациентов с локальным процессом (пло-

щадь поражения менее 5%). Кожный процесс ограничивался локтевыми и подколенными сгибами или областью тыла кистей или лучезапястных суставов. Установлена прямая корреляция между уровнем кандидозной антигенемии и тяжестью процесса ( $r=0,88$ ,  $p<0,05$ ), а также с длительностью заболевания ( $r=0,82$ ,  $p<0,05$ ). Выявление циркулирующего антигена *Candida albicans* может указывать на переход от колонизации кожных покровов грибами рода *Candida* к инвазивной форме кандидоза с развитием осложненного течения атопического дерматита кандидозной инфекцией [9].

В контрольной группе детей, куда вошли сыворотки здоровых и больных кожными заболеваниями (ихтиоз, экзема, псориаз, атопический дерматит) с отрицательными результатами культуральных исследований на грибы антиген не обнаруживался или присутствовал в следовых количествах. Отсутствовали также перекрестные реакции с циркулирующим

антигеном *Trichophyton rubrum*, как в модельных опытах, так и в сыворотках больных трихофитией.

Согласно литературным данным, кандидозный антиген быстро элиминируется из сыворотки крови под действием атимикотической терапии и обратного развития клинических симптомов заболевания [8]. Полученные результаты показывают, что после лечения поверхностного и висцерального кандидоза противогрибковыми средствами определяется снижение концентрации циркулирующего кандидозного антигена в сыворотке крови до следовых количеств. Так, у больного с бронхолегочным кандидозом (рис 1) концентрация циркулирующего кандидозного антигена до лечения составила  $1,2 \times 10^{-5}$  мг/мл. После I курса лечения дифлюканом (в дозе 150 мг 1 раз в неделю № 4) уровень антигена снизился до  $10^{-8}$  мг/мл, а после II и III курсов терапии (еще через 2 месяца) не определялся вообще.

У пациента с атопическим дерматитом, осложненным кандидозной инфекцией, имеющим тяжелое течение заболевания и устойчивость к противоал-

лергической терапии уровень циркулирующего кандидозного антигена до лечения составила  $2 \times 10^{-4}$  мг/мл (рис. 2). После I курса терапии дифлюканом (в дозе 150 мг 1 раз в неделю № 4) его концентрация снизилась до  $1,5 \times 10^{-5}$  мг/мл, II и III курсов (через 3 месяца) — до  $2 \times 10^{-7}$  мг/мл, IV, V, VI курсов (через 6 месяцев) результат был отрицательный ( $10^{-10}$  мг/мл) на фоне достижения клинической ремиссии заболевания в впервые за последние 5 лет.

Итак, положительная динамика при кандидозах после назначения атимикотической терапии, проявляющаяся в достижении клинической ремиссии заболевания на фоне элиминации циркулирующего кандидозного антигена подтверждает диагностическую значимость ИФС.

Таким образом, предлагаемый вариант иммуноферментного анализа с помощью иммуноферментного сенсора может быть использован для чувствительного, селективного и экспрессного определения кандидозного антигена при диагностике и в динамике лечения поверхностного, висцерального и системного кандидоза.

## Литература

1. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином-пресс; 2003: 446.
2. Биосенсоры: основы и приложения. (Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона; Пер. с англ. И. Г. Абидора). М.: Мир; 1992: 616.
3. Morgan C.L., Newman D.J., Price C.P. Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine. Clin. Chem. 1996; 42 (2): 193–209.
4. Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К. Иммуносенсоры в биологии и медицине; аналитические возможности, проблемы и перспективы. Журнал Аналитической химии. 2001; 56 (10): 1015–31.
5. Кутырева М.П., Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К. Определение антигена *Candida albicans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора. Вопросы медицинской химии. 1998; 44 (2): 172–8.
6. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C. Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum*. Analytica Chimica Acta. 2000; 411: 13–8.
7. Лукашков В.М., Глушко Н.И., Шахбазова Е.Н. Вершинин А.А. Характеристика аллергена Кандида альбиканс. Инфекционная аллергия и иммунитет. Казань; 1983: 31–6.
8. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада-Х, 2001: 472.
9. Маланичева Т.Г., Софронов В.В., Глушко И.И., Халдеева Е.В. Новые подходы к диагностике и лечению атопического дерматита у детей, осложненного микотической инфекцией. Практическая медицина. 2002; 1: 50–1.