

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

POROVNÁNÍ DVOU IMUNO-ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI VIRU KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Článek je věnován 100. výročí založení Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

EKATERINA KHRISTUNOVA^{a,b,c}, JIŘÍ BAREK^{a,b}, BOHUMIL KRATOCHVÍL^{a,c}, ELENA KOROTKOVA^a, ELENA DOROZHKO^a a VLASTIMIL VYSKOČIL^b

^a National Research Tomsk Polytechnic University, Lenin Avenue 30, 634050 Tomsk, Ruská federace, ^b UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2, Česká republika, ^c Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Došlo 20.3.20, přijato 30.3.20.

Klíčová slova: ELISA, imunosenzor, elektrochemie, bioanalytické metody, protilátky, klíčová encefalitida

Úvod

Imunoanalytické metody hrají důležitou roli při detekci protilátek proti různým virovým patogenům v klinických a biologických vzorcích^{1–3}. Nejběžnějším dostupným analytickým a biochemickým způsobem detekce protilátek je enzymová imunoanalýza (ELISA, z angl. enzyme-linked immunosorbent assay), při které se enzymy používají jako značky pro detekci cílových molekul, jež v roztoku se substrátem poskytují měřitelný signál^{4,5}, nejčastěji spektrofotometrický. Nevýhodou použití enzymů je pokles jejich enzymatické aktivity s časem (na 70 až 50 %). Kromě toho musí být enzymy skladovány pouze při nízkých teplotách nebo v konzervačních roztocích, což vyžaduje pravidelné kontrolování jejich účinnosti a častou a rutinní validaci testovacích systémů ELISA (cit.⁶).

Z výše uvedených důvodů roste v posledních desetiletích zájem o vývoj elektrochemických imunosenzorů, především vzhledem k jejich vysoké citlivosti, relativně nízkým pořizovacím a provozním nákladům a možností jejich miniaturizace^{7–11}. Elektrochemické imunosenzory

měří intenzitu elektrického signálu, který přímo či nepřímo poskytují produkty interakcí mezi protilátkou a antigenem, a tím kombinují specifitu imunochemické reakce s výhodami elektrochemické detekce. V závislosti na zvolené detekční technice se pak měří elektrická vodivost, elektrický proud, elektrodový potenciál, elektrická kapacita nebo elektrická impedance^{12,13}.

Nejčastěji využívané elektrochemické imunosenzory jsou založeny na kovových nanočásticích (např. zlatých, stříbrných, měděných) použitých jako značky pro elektrochemickou detekci cílových biomolekul^{14–16}. Ve většině publikací zaměřených na elektrochemickou detekci biomolekul byly použity stříbrné nanočástice (AgNP, z angl. silver nanoparticle)^{15–17} vzhledem k celé řadě výhod, od snadné přípravy přes dobře prostudované vlastnosti až po znalost jejich chování při těchto stanoveních. Proto i v našem případě byly vybrány AgNP právě vzhledem k jejich relativně jednoduché přípravě a jasně definovanému voltametrickému signálu poskytovanému ionty stříbra uvolněnými z AgNP.

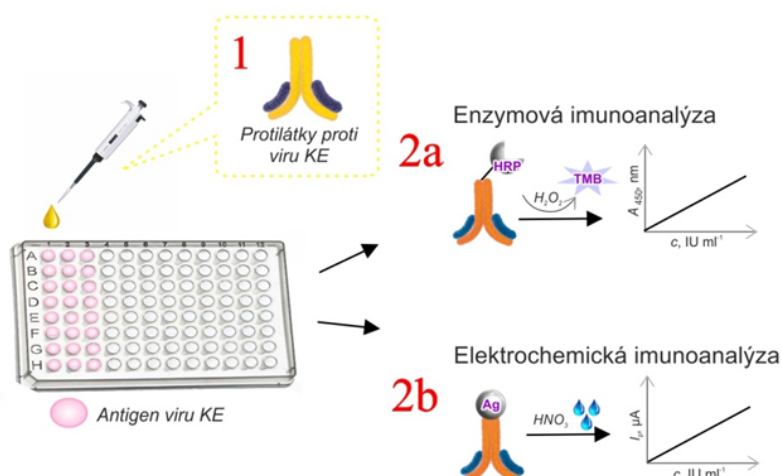
Tato práce je zaměřena na stanovení protilátek proti viru klíšťové encefalitidy (KE), který je původcem lidské virové infekce centrálního nervového systému (CNS) v endemických oblastech Evropy a Asie¹⁸. Nejčastěji se tato nemoc projevuje horečkou, bolestí hlavy a záchvaty. Dalšími projevy mohou být fokální neurologický deficit a kóma¹⁹. Je proto nutné onemocnění diagnostikovat co nejdříve, aby se včas zahájila léčba. Infekce virem KE způsobuje imunitní reakci buněk lidského těla, a v důsledku toho začíná produkce protilátek proti KE²⁰, což lze využít ke včasné diagnóze tohoto onemocnění.

Cílem této práce bylo testování a porovnání dvou imunoanalytických metod – enzymové imunoanalýzy (ELISA) a voltametrické imunoanalýzy – pro detekci protilátek proti viru KE v modelových vodných prostředích a aplikace získaných poznatků na stanovení protilátek proti viru KE v lidském krevním séru.

Experimentální část

Enzymová imunoanalýza

Byla použita komerční sada anti-TBEV (z angl. tick-borne encephalitis virus – virus klíšťové encefalitidy) ELISA „Vienna“ IgG (Vector-Best, Novosibirsk, Rusko). Imobilizace biologického materiálu byla provedena v jamkách mikrotitračních destiček potažených antigenem viru KE. Během první fáze (obr. 1, krok 1) bylo na mikrotitrační destičku dávkováno 100 μ l specifických protilátek (Vector-Best) o různé koncentraci: 100, 400, 800, 1200 a 1600 IU ml⁻¹. Imobilizace probíhala 1 h při teplotě 37 °C. Po trojnásobném promytí destičky promývacím roztokem fosfátového pufru (0,1 M, pH 7,4) obsahujícím 0,05 % Tween 20 bylo do všech jamek destičky dávkováno 100 μ l



Obr. 1. Schematické znázornění dvou přístupů pro detekci protilátek proti viru klíšťové encefalitidy (KE). (HRP – křenová peroxidasa, TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, A_{450} – absorbance při 450 nm, I_p – proud anodického voltametrického píku elementárního stříbra, c – koncentrace specifických protilátek proti viru KE)

konjugátu (protilátky proti viru KE značené křenovou peroxidasou (HRP), obr. 1, krok 2a). Reakce probíhala 1 h při 37 °C a nenavázaný konjugát byl vymyt třikrát 300 μ l promývacího roztoku. Následně bylo do všech jamek destičky aplikováno 100 μ l 0,1M 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) s obsahem peroxidu vodíku (0,01 %) a destička byla inkubována 30 min při teplotě 25 °C.

Reakce byla zastavena přidávkou 0,1M H₂SO₄. Barvená změna byla sledována spektrofotometricky v jamkách mikrotitrační destičky pomocí analyzátoru Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm proti deionizované vodě jako blanku. Z naměřených hodnot absorbance standardů o různých koncentracích byla sestavena kalibrační závislost, ze které byla odečtena koncentrace protilátek ve vzorku krve. Celkový čas enzymové imunoanalýzy byl 3 h, přičemž čas koncové analýzy (neimunologické části analytické procedury) byl 30 min.

Voltametrická imunoanalýza

Schematické znázornění tohoto přístupu je ukázáno na obr. 1 (krok 2b), přičemž uvedený detekční princip je založen na měření voltametrického signálu stříbra – elektrochemické rozpouštění elementárního stříbra za pomoci anodické rozpouštěcí voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu (LSASV, z angl. linear sweep anodic stripping voltammetry) uvolňovaného z konjugátu obsahujícího AgNP s protilátkami (Ab, z angl. antibody) proti KE ($Ab_S@AgNP$).

Konjugát $Ab_S@AgNP$ byl připraven následujícím postupem: nejprve byly syntetizovány AgNP redukcí AgNO₃ tetrahydridoboritanem sodným podle postupu po-

psaného v práci²¹; dále bylo 5 ml roztoku AgNP centrifugováno při 15 000 otáček min⁻¹ (při 4 °C) po dobu 10 min; po odstředění byl použit fosfátový pufr (2 ml, 0,1 M, pH 7,4) obsahující rozštěpené protilátky proti viru KE (10 μ g ml⁻¹) k resuspendování pelety AgNP (protilátky proti viru KE byly rozštěpené podle metody Grega T. Hermanson²²).

Pro detekci protilátek proti viru KE bylo do každé jamky přidáno 0,3 ml 1M HNO₃, aby se rozpustily AgNP z konjugátu $Ab_S@AgNP$ (obr. 1, krok 2b). Poté byly vzorky obsahující stříbrné ionty přeneseny do 7 ml 0,5M KNO₃. Uvolněné stříbrné ionty byly následně stanovovány pomocí LSASV. Měření bylo prováděno v tříelektrodovém systému, kde pracovní elektrodou byla grafitová kompozitní elektroda (GE), vyrobená společností UMX (Tomsk, Rusko). Tyčinky ze spektrálního grafitu o průměru 5 mm byly impregnovány roztaveným parafinem (bod tání 58 až 60 °C, Fluka, Seelze, Německo) za sníženého tlaku. Povrch elektrody byl regenerován mechanickým leštěním o filtrační papír. Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda (1M KCl) a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda. Všechna voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru TAlab (Tomanalyt LLC, Tomsk, Rusko) s použitím softwaru dodaného výrobcem. Stanovení stříbrných iontů uvolněných z konjugátu $Ab_S@AgNP$ pomocí LSASV na GE s akumulacním potenciálem -0,8 V a akumulacním časem 60 s bylo provedeno v roztoku elektrolytu obsahujícím 0,04M HNO₃ a 0,5M KNO₃ v potenciálovém rozmezí -0,2 až +0,6 V s rychlostí polarizace 100 mV s⁻¹. Celkový čas elektrochemické imunoanalýzy byl 2 h 45 min a dílčí čas koncové voltametrické analýzy (neimunologické části analytické procedury) byl 15 min.

Analýza lidského krevního séra

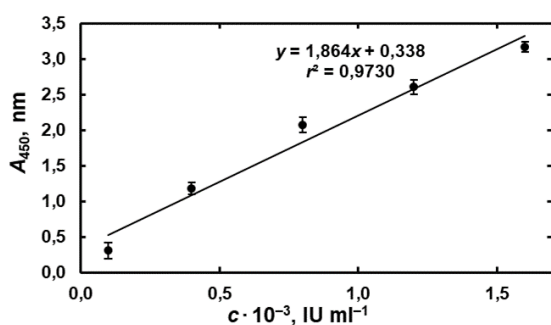
Pro aplikaci těchto dvou imunoanalytických metod v biologických tekutinách bylo k 0,09 ml 0,1M fosfátového pufru (pH 7,4) s obsahem protilátek proti viru KE (800 a 1600 IU ml⁻¹) přidáno 0,01 ml vzorku krevního séra zdravých dobrovolníků.

Výsledky a diskuse

Cílem této práce bylo porovnání výsledků spektrofotometrického stanovení (enzymová imunoanalýza) a elektrochemického stanovení (voltametrická imunoanalýza) specifických protilátek proti viru KE za použití komerčně dostupné sady anti-TBEV IgG ELISA (Vector-Best). Pro zjišťování přítomnosti protilátek byl vybrán nepřímý nekompetitivní formát analýzy.

Nejprve byly testovány různé koncentrace protilátek proti viru KE (o koncentracích 100–1600 IU ml⁻¹) z komerční sady anti-TBEV IgG ELISA, kde bylo pomocí specifického konjugátu značeného křenovou peroxidasou prováděno spektrofotometrické stanovení imobilizovaných protilátek. Tato komerční sada neobsahovala nulovou koncentraci protilátky. Měření absorbance vzorku při vlnové délce 450 nm (postup udávaný výrobcem sady anti-TBEV IgG ELISA) bylo pro každou koncentraci vždy pětkrát opakováno a pro konstrukci kalibrační přímky byl zvolen medián z těchto získaných hodnot absorbance. Příslušná kalibrační závislost je uvedena na obr. 2. K proložení experimentálních bodů byla použita jednodušší lineární regrese doporučovaná výrobcem komerční sady anti-TBEV IgG ELISA. Použití složitější a v praxi méně často používané polynommické regrese vedlo ke srovnatelným výsledkům.

Z naměřených hodnot absorbance při 450 nm bylo poté možné po dosažení do regresní rovnice $y = 1,864x +$

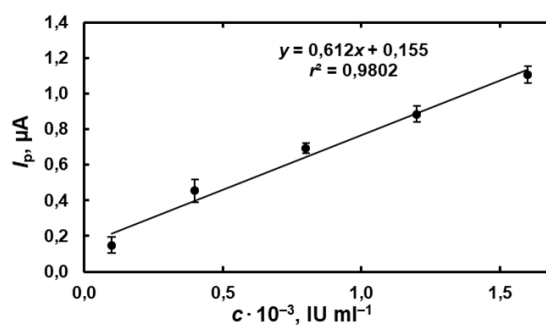


Obr. 2. Kalibrační závislost pro stanovení protilátek proti viru KE metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA) se spektrofotometrickou koncovkou. Spektrofotometrická detekce probíhala v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm proti deionizované vodě jako blanku; vložena je rovnice regresní přímky s uvedeným koeficientem determinace (r^2); chybové úsečky jsou zkonstruovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n = 5$)

0,338 ($r^2 = 0,9730$) stanovit množství protilátek proti viru KE v lidském krevním séru. Pro jednoduchost a vzhledem k charakteru požadované informace nejsou v regresních rovnicích uváděny rozměry závisle a nezávisle proměnných a příslušných úseků a směrnice a jejich intervalů spolehlivosti. Jak již bylo uvedeno, kalibrační závislost byla sestrojena pomocí komerční sady s různým obsahem protilátek, která neobsahovala nulovou koncentraci. Nenulová hodnota úseku na obr. 2 i obr. 3 souvisí s určitou absorbančí či s určitým elektrochemickým signálem samotného slepého pokusu. Mez detekce ($LOD = 3s/b$, kde s je směrodatná odchylka signálu slepého vzorku a b je směrnice kalibrační přímky) činila 30 IU ml⁻¹.

Poté bylo provedeno elektrochemické stanovení protilátek proti viru KE, při kterém byl použit konjugát se stříbrnými nanočásticemi $Ab_s@AgNP$ jako rozpoznávací prvek. Tento konjugát byl připraven metodou popsanou v Experimentální části. Voltametrická detekce byla založena na rozpuštění navázaného $Ab_s@AgNP$ v 0,3 ml 1M HNO₃ v jamkách mikrotitrační destičky během 15 min a následném stanovení uvolněných iontů stříbra technikou LSASV na GE s následujícími parametry: základní elektrolyt 0,04M HNO₃ a 0,5M KNO₃, rozsah potenciálů $-0,2$ až $+0,6$ V, rychlost polarizace 100 mV s⁻¹, akumulací potenciál $-0,8$ V a akumulací čas 60 s. LSASV umožňuje dosažení dostatečně nízké LOD. Při dalším vývoji metody se počítá i s využitím diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltetrie a s přímým stanovením uvolněných iontů stříbra v jamkách mikrotitrační destičky pomocí miniaturizované pracovní elektrody bez jejich přenosu do voltametrické nádoby. Při konstrukci kalibrační závislosti byla odečtena absolutní hodnota proudu stříbrných iontů při kontrolních experimentech.

Pro ověření využitelnosti voltametrické imunoanalýzy využívající vznik konjugátu $Ab_s@AgNP$ bylo provedeno pět nezávislých stanovení pro každou koncentraci protilátek proti viru KE (zvolené koncentrační rozmezí



Obr. 3. Kalibrační závislost pro stanovení protilátek proti viru KE metodou voltametrické imunoanalýzy. Hodnota proudu piku (I_p) při LSASV na GE byla odečtena při potenciálu piku ležícího v rozmezí od $+0,20$ do $+0,25$ V; vložena je rovnice regresní přímky s uvedeným koeficientem determinace (r^2); chybové úsečky jsou zkonstruovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n = 5$)

Tabulka I

Porovnání obou imunoanalytických přístupů pro stanovení protilátek proti viru KE v lidském krevním séru ($n = 5$)

Metoda	Koncentrace protilátek [IU ml ⁻¹]		Variační koeficient ^a [%]	Výtěžnost [%]
	přidáno	nalezeno		
ELISA	800	840 ± 18	2,15	105
	1600	1625 ± 25	1,53	102
Voltametrická imunoanalýza	800	808 ± 19	2,35	101
	1600	1558 ± 41	2,63	97

^a Variační koeficient bývá též označován jako relativní směrodatná odchylka (s_r)

100–1600 IU ml⁻¹) z komerční sady anti-TBEV IgG ELISA (Vector-Best). Odpovídající kalibrační závislost je zobrazena na obr. 3.

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci protilátek proti viru KE je lineární v rozmezí 100–1600 IU ml⁻¹, což odpovídá stejnému lineárnímu koncentračnímu rozsahu jako u metody ELISA. Mez detekce pro voltametrickou imunoanalýzu ($LOD = 3s/b$, kde s je směrodatná odchylka signálu slepého vzorku a b je směrnice kalibrační přímky) činila 90 IU ml⁻¹.

Praktická využitelnost obou imunoanalytických přístupů byla ověřena stanovením množství protilátek proti viru KE v lidském krevním séru. Výsledky stanovení jsou shrnuty v tab. I. Pro ověření správnosti obou testů byla provedena verifikace pomocí určení výtěžnosti metod, která je vyjádřena jako poměr nalezené a přidané koncentrace protilátek proti viru KE v lidském krevním séru. Získané výsledky jasně ukazují, že hodnoty koncentrací protilátek proti viru KE stanovené pomocí spektrofotometrické a voltametrické detekční koncovky odpovídají hodnotám přidaných koncentrací k lidskému krevnímu séru a nejsou statisticky odlišné na hladině významnosti 0,05.

Závěr

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že obě metody byly úspěšně použity pro kontrolu množství protilátek proti viru KE v lidském krevním séru a poskytovaly výsledky, které nejsou statisticky odlišné na hladině významnosti 0,05. Hodnota variačního koeficientu byla ve všech případech menší než 5 %. ELISA je poněkud citlivější ve srovnání s elektrochemickou imunoanalýzou a poskytuje nižší mez detekce. Hlavní výhodou voltametrické analýzy je zkrácení času koncové analýzy (neimunologické části analytické procedury) z 30 min u enzymatické imunoanalýzy na 15 min u voltametrické imunoanalýzy. Kromě toho ELISA vyžaduje relativně drahé vybavení a zvýšenou spotřebu chemických činidel ve srovnání s voltametrickým přístupem, který tak může být použit jako vhodná alternativa pro metodu ELISA při stanovení protilátek proti viru KE.

Tento výzkum byl financován agenturou Russian Foundation for Basic Research (projekt RFBR 19-53-26001 a projekt RF FSFW-2020-0022 (Russian State assignment "Science")) a Grantovou agenturou České republiky (projekt GACR 20-01417J) a vznikl v rámci projektu A2_FCHT_2020_016 Specifického vysokoškolského výzkumu Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

LITERATURA

1. Pampalakis G., Kelley S. O.: *Analyst* 134, 447 (2009).
2. Farka Z., Juřík T., Kovář D., Trnková L., Skládal P.: *Chem. Rev.* 117, 9973 (2017).
3. Stejskal D., Humenanská V., Vrtal R., Solichová P., Karpíšek M., Petzel M., Švesták M.: *Chem. Listy* 103, 73 (2009).
4. Ackermann-Gäumann R., Tritten M.-L., Hassan M., Lienhard R.: *Ticks Tick-Borne Dis.* 9, 956 (2018).
5. Arya S. K., Estrela P.: *Sensors* 18, 2010 (2018).
6. Khristunova Y., Korotkova E., Kratochvil B., Berek J., Dorozhko E., Vyskocil V., Plotnikov E., Voronova O., Sidelnikov V.: *Sensors* 19, 2103 (2019).
7. Abdorahim M., Rabiee M., Alhosseini S. N., Tahriri M., Yazdanpanah S., Alavi S. H., Tayebi L.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 82, 337 (2016).
8. Zhao G., Wang Y., Li X., Yue Q., Dong X., Du B., Cao W., Wei Q.: *Anal. Chem.* 91, 1989 (2019).
9. Hao N., Li H., Iong Y., Zhang L., Zhao X., Xu D., Chen H.-Y.: *J. Electroanal. Chem.* 656, 50 (2011).
10. Abbaspour A., Norouz-Sarvestani F., Noori A., Soltani N.: *Biosens. Bioelectron.* 68, 149 (2015).
11. Szymanski M. S., Porter R. A.: *J. Immunol. Methods* 387, 262 (2013).
12. Felix F. S., Angnes L.: *Biosens. Bioelectron.* 102, 470 (2018).
13. Wen W., Yan X., Zhu C., Du D., Lin Y.: *Anal. Chem.* 89, 138 (2017).
14. Dequaire M., Degrand C., Limoges B.: *Anal. Chem.* 72, 5521 (2000).
15. Tauran Y., Brioude A., Coleman A. W., Rhimi M., Kim B.: *World J. Biol. Chem.* 4, 35 (2013).
16. Song W., Li H., Liu H., Wu Z., Qiang W., Xu D.: *Electrochem. Commun.* 31, 16 (2013).

17. Roushani M., Shahdost-Fard F.: *Sens. Actuators, B* 207, 764 (2015).
18. Kunze U.: *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 399 (2016).
19. Ergunay K., Tkachev S., Kozlova I., Růžek D.: *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 16, 4 (2016).
20. Pulkkinen L. I. A., Butcher S. J., Anastasina M.: *Viruses* 10, 350 (2018).
21. Mulfinger L., Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky S. A., Boritz C.: *J. Chem. Educ.* 84, 322 (2007).
22. Hermanson G. T.: *Bioconjugate Techniques*, 2. vyd. Academic Press, Oxford 2008.

E. Khristunova^{a,b,c}, J. Barek^{a,b}, B. Kratochvíl^{a,c}, E. Korotkova^a, E. Dorozhko^a, and V. Vyskočil^b
 (^aNational Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia, ^bUNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic, ^cDepartment of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic):
Comparison of Two Immunoanalytical Methods for Determination of Antibodies to Tick-Borne Encephalitis Virus

A highly effective way to improve the prognosis of viral infectious diseases is early detection of antibodies to various viral pathogens in biological fluids. Among a wide range of viral pathogens, tick-borne encephalitis virus (TBEV) attracts a special attention. This work reports a comparison between two bioanalytical methods (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and voltammetric immunoassay) to determine antibodies to TBEV

in a human blood serum. In these assays, the detected molecule binds to the conjugate which is labelled with enzyme (in ELISA) or silver nanoparticles (in voltammetric immunoassay). In the ELISA, the signal corresponding to a colour-producing substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) through an enzymatic reaction is detected using a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. In the electrochemical immunoassay, the signal is read by the linear sweep anodic stripping voltammetry (LSASV) of silver ions (through the electrochemical stripping of accumulated elemental silver) on a graphite composite electrode. The results of both measurements demonstrated that signals increased with the increasing concentration of the target antibodies to TBEV within the range from 100 to 1600 IU mL⁻¹. Detection limits for ELISA and voltammetric assay were 30 and 90 IU mL⁻¹, respectively. The practical application of both immunoanalytical approaches has been verified by determining the amount of antibodies to TBEV in the human blood serum. The obtained results clearly showed an excellent agreement between the detected concentration values of antibodies to TBEV obtained by the electrochemical method and by the standard ELISA method.

Keywords: ELISA, immunosensor, electrochemistry, bioanalytical methods, antibodies, tick-borne encephalitis

Acknowledgements

The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research (project RFBR 19-53-26001 and project RF FSWW-2020-0022 (Russian State assignment "Science")) and by the Czech Science Foundation (project GACR 20-01417J). This work was further supported by grant A2_FCHT_2020_016 of Specific university research of the University of Chemistry and Technology, Prague.