

# СРАВНЕНИЕ ИФА С ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG-АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ ЧЕЛОВЕКА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Кудряшова А.М., Михайлова Н.А., Борисова О.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Резюме.** Серьезной проблемой терапии препаратами рекомбинантного человеческого эритропоэтина является выработка антител к эритропоэтинстимулирующим препаратам, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности терапии. При длительном лечении препаратами эритропоэтина в редких случаях может происходить выработка нейтрализующих антител, приводящих к полной аплазии красного костного мозга. Определение антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является важным этапом оценки их иммуногенности на этапах доклинических и клинических исследований, а также в ходе терапии препаратами эритропоэтина. Проведено сравнение методов выявления специфических IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом с применением колориметрической и хемилюминесцентной детекции, в системах 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – пероксид водорода и люминол – пероксид водорода соответственно. Выявление антител проводили в сыворотках крови экспериментальных животных – кроликов и морских свинок – полученных после введения животным разных доз препаратов пегилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина подковожно или внутривенно. В качестве контроля использовали аффинно очищенные поликлональные антитела кролика к эритропоэтину человека. Исследовано влияние концентрации перекиси водорода и люминола на чувствительность хемилюминесцентного метода. Показано, что при использовании для усиления хемилюминесценции 4-йодофенола наблюдается повышение чувствительности в 1,5-2 раза. Сравнение интенсивности хемилюминесценции во времени показало большую стабильность во времени для субстратной смеси, приготовленной на боратном буфере. Снижение хемилюминесцентного сигнала во времени было пропорционально снижению фонового сигнала, что делало соотношение сигнал/фон стабильным в течение 3-30 мин. В результате оптимизации состава субстратной смеси и условий проведения регистрации интенсивности хемилюминесценции минимальное количество аффинно очищенных поликлональных антител кролика к эритропоэтину человека, выявленных в методе с хемилюминесцентной детекцией, составило 0,08 нг/мл, а с колориметрической детекцией – 0,6 нг/мл. Диапазон измерений при этом был расширен более чем в 20 раз. При выявлении специфических IgG антител к эритропоэтину человека в сыворотках крови экспериментальных животных методом с хемилюминесцентной детекцией показано увеличение чувствительности, определяемое путем сравнения

## Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин  
и сывороток имени И.И. Мечникова»  
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.  
Тел.: 8 (495) 674-54-97.  
E-mail: 2238250@rambler.ru

## Address for correspondence:

Kudryashova Alexandra M.  
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera  
115088, Russian Federation, Moscow,  
1<sup>st</sup> Dubrovskaya str., 15.  
Phone: 7 (495) 674-54-97.  
E-mail: 2238250@rambler.ru

## Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Н.А. Михайлова, О.В. Борисова  
«Сравнение ИФА с хемилюминесцентной  
и колориметрической детекцией для выявления  
специфических IgG-антител к эритропоэтину человека  
в сыворотках крови экспериментальных животных»  
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.  
С. 935-942. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942  
© Кудряшова А.М. и соавт., 2018

## For citation:

A.M. Kudryashova, N.A. Mikhailova, O.V. Borisova  
“Comparison of colorimetric and chemiluminescent ELISA  
tests for detection of IgG antibodies to human EPO in the sera  
of experimental animals”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6,  
pp. 935-942.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942  
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942

индексов позитивности анализируемых образцов, в 1,9-2,6 раза в сыворотках кроликов и в 1,8-8,9 раза в сыворотках морских свинок. Выявлена корреляция при количественном определении антител в сыворотках кроликов двумя методами ( $R = 0,981$ ). Таким образом, хемилюминесцентный метод детекции позволил повысить чувствительность выявления IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом.

*Ключевые слова:* хемилюминесценция, рекомбинантный эритропоэтин, твердофазный ИФА, антитела к эритропоэтину, люминол, иммуногенность

## COMPARISON OF COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT ELISA TESTS FOR DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO HUMAN EPO IN THE SERA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Kudryashova A.M., Mikhailova N.A., Borisova O.V.

*I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Production of antibodies to erythropoietin-stimulating drugs is an important problem of therapy with recombinant human erythropoietin (EPO). It leads to changes in the pharmacokinetic profile and decreased therapeutic efficiency. Upon long-term treatment with EPO preparations, neutralizing antibodies can result in rare cases, thus leading to complete pure red cell aplasia. Hence, detection of antibodies to EPO is an important stage in the assessment of the drug immunogenicity in preclinical and clinical studies, as well as during the treatment with EPO. We have compared colorimetric and chemiluminescent ELISA tests for detection of IgG antibodies to human EPO with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – hydrogen peroxide and luminol –hydrogen peroxide detection systems, respectively. Antibodies to human EPO were determined in blood serum samples of experimental animals, i.e., rabbits and guinea pigs following their immunization with different doses of pegylated human recombinant EPO-beta subcutaneously or intravenously. The affinity-purified rabbit polyclonal antibodies to human EPO were used as a reference material. The effects of hydrogen peroxide and luminol concentrations upon sensitivity of a chemiluminescent method were also studied. We have shown a 1.5-2-fold increase in sensitivity when using 4-iodophenol for amplification of chemiluminescence. A comparison of the chemiluminescence intensity with time has demonstrated a better stability for the substrate mixture prepared on borate buffer. A decrease in chemiluminescence signal with time was proportional to the decrease in background signal, thus rendering stability of the signal/background ratio for 3 to 30 minutes. Due to optimizing the substrate mixture composition and conditions of chemiluminescence recording, the reached detection limits for colorimetric and chemiluminescent ELISA's were, respectively, 0.6 ng/ml and 0.08 ng/ml. The measurement range was extended by more than 20 times for chemiluminescent ELISA. The chemiluminescent ELISA for anti-erythropoietin antibody detection showed a 1.9 to 2.6-fold increase in sensitivity for rabbit serum, and 1.8 to 8.9-fold for guinea pigs serum. Good correlation of results was found for quantitative detection of antibodies in rabbit sera using the two methods ( $R = 0.981$ ). Thus, chemiluminescent ELISA allowed develop a more sensitive detection technique of IgG antibodies to human erythropoietin.

*Keywords:* chemiluminescence, recombinant erythropoietin, ELISA, antibodies to EPO, luminol, immunogenicity

### Введение

Препараты рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО) используют для лечения пациентов с эритропоэтиндефицитными анемиями. Серьезной проблемой такой терапии является выработка антител к эритропоэтинстимулирующим препаратам, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности лечения. При длительном приеме препаратов эритропоэтина может происходить выработка нейтрализующих антител, спо-

собных перекрестно реагировать с эндогенным эритропоэтином, что приводит к редкому, но тяжелому осложнению – полной аплазии красного костного мозга (ПАККМ). Определение антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является важным этапом оценки их иммуногенности на этапах доклинических и клинических исследований, а также в ходе терапии препаратами эритропоэтина [1, 4, 5]. Основная задача заключается в определении антител в образцах сывороток в максимально низких концентрациях как основном моменте в понимании причин

снижения терапевтической эффективности препаратов эритропоэтина и диагностики ПАККМ на ранних стадиях. Наиболее часто для определения антител к эритропоэтину используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), как метод, обладающий высокой чувствительностью и доступностью. В ряде исследований показано, что замена ИФА с колориметрической детекцией на хемилюминесцентную имела ряд преимуществ [6, 8], в том числе и для выявления антител к чЭПО [7].

**Целью данной работы** было сравнение методов выявления специфических IgG-антител к эритропоэтину человека ИФА с применением колориметрической и хемилюминесцентной детекции.

## Материалы и методы

3,3',5,5'-тетраметилбензидин, люминол, р-гидроксикоричная кислота (Fluka); 4-йодофенол и 4-фенилфенол (Sigma), стрептавидин («Сорбент-сервис», Москва). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты, прозрачные для колориметрической детекции (Costar) и белые непрозрачные для хемилюминесцентной (Nunc). Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (рчЭПО, Shandong Kexing Bioproducts), аффинно очищенные антитела кролика к эритропоэтину человека (ПАТ кролика к чЭПО, ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург), антитела козы к IgG кролика (H+L), конъюгированные с пероксидазой (Thermo Scientific), антитела кролика к IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой (Thermo Scientific).

Сыворотки крови экспериментальных животных — кроликов и морских свинок — предоставлены Биофармацевтической компанией ООО «ФОРТ», Москва, Россия. Сыворотки получены после введения животным препаратов ПЭГ-ЭПО (пэгилированный рчЭПО-β) [3] и метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтина бета (Мирцера®, Hoffmann-La Roche Inc.) в течение 28 дней один раз в неделю подкожно (кролики) и внутривенно (кролики и морские свинки) в дозе 2,5 мкг/кг и 5 мкг/кг и последующего забора крови через 14 дней после последней инъекции (в каждую группу входило от 3 до 8 экспериментальных животных).

Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRadModel 680. Для регистрации результатов люминесценции использовали микропланшетный детектор Varioskan Flach (Thermo Scientific).

Инкубацию планшета проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при режиме 500 об/мин и температуре

37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшет на планшетном промывателе (StatFax).

Выявление антител к чЭПО в сыворотках экспериментальных животных проводили прямым методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл рчЕРО в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 5 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С и на 1 час вносили блокирующий раствор—0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20. Далее вносили поликлональные антитела кролика к чЭПО или образцы сывороток животных в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Твин 20. После инкубации в течение 45 минут и отмывки вносили по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител козы к IgG кролика (H+L) либо антител кролика к IgG морской свинки в разведении 1:15 соответственно. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

При хемилюминесцентной детекции, после осуществления иммунологических реакций в белых непрозрачных планшетах, вносили субстратную смесь по 100 мкл в каждую лунку, выдерживали 5 минут при режиме встряхивания 500 об/мин и проводили измерение. Эмиссию света с поверхности каждой лунки регистрировали в течение 10 мс.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность определения оценивалась двумя способами:

— сравнивали значения индексов позитивности анализируемых сывороток, определяемые как отношение  $S$  образца/ $S$  порог., где  $S$  порог. =  $Scp.K- + 3\sigma$ , где  $Scp.K-$  — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для нормальной пулированной сыворотки экспериментальных животных (6-10 повторов);

— чувствительность (предел обнаружения) определяли как количество антител к эритропоэтину, при котором  $S$  образца/ $S$  порог. = 1.

При колориметрической детекции  $S = ОП$ , где ОП — оптическая плотность; при хемилюминес-

центной –  $S = I$ , где  $I$  – интенсивность люминесценции.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (OriginLabCorporation). Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее  $S$  образца/ $S$  порог.  $\pm$  стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина  $p \leq 0,05$  рассматривалась как статистически значимая.

## Результаты

На первой стадии работы проведена оптимизация определения пероксидазы с помощью хемилюминесцентной реакции в системе люминол – пероксид водорода, усиленной фенольными соединениями, при определении ПАТ кролика к чЭПО.

Исследованы субстратные буферные смеси с содержанием разных концентраций люминола в диапазоне 0,05-10 мМ и пероксида водорода в диапазоне 20-0,3 мМ (рис. 1). Полученные результаты показали колоколообразную зависимость индекса позитивности от концентрации перекиси водорода с максимумом около 0,6 мМ. При этом уменьшение индекса позитивности при концентрации  $H_2O_2$  выше 0,6 мМ связано с сильным ростом фонового сигнала. При оптимальной концентрации перекиси водорода максимальное отношение  $S$  образца/ $S$  порог. наблюдалось при концентрации люминола 0,1 мМ. Соответственно,

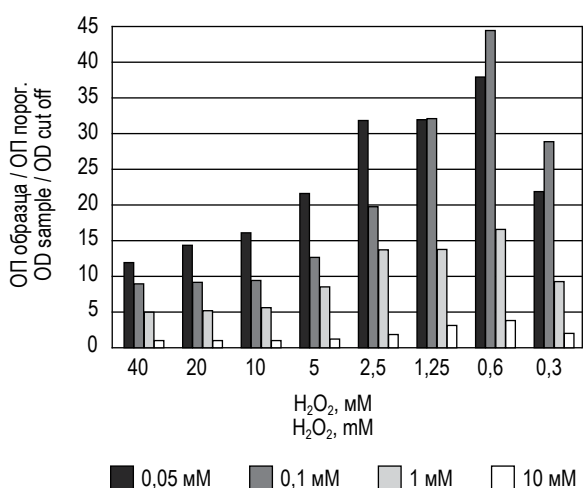


Рисунок 1. Подбор оптимальных концентраций соотношения люминол (0,05-10 мМ) – пероксид водорода

Figure 1. Selection of optimal concentrations ratio of luminol (0.05-10 mM) – hydrogen peroxide

но, концентрации люминола 0,1 мМ и пероксида водорода 0,6 мМ в дальнейшем использовали в настоящей работе при приготовлении субстратной буферной смеси для хемилюминесцентной детекции сигнала.

Для усиления хемилюминесценции исследованы: *p*-гидроксикоричная кислота, 4-йодофенол и 4-фенилфенол [9, 10]. Наибольшая интенсивность хемилюминесцентного сигнала и повышение чувствительности в 1,5-2,0 раза достигнуты с использованием 4-йодофенола в концентрации 0,62 мМ (диапазон концентраций 4 мМ – 0,03 мМ). Уменьшение концентрации 4-йодофенола приводило к резкому падению хемилюминесцентного сигнала, а увеличение – к росту фонового сигнала.

В данной работе для приготовления субстратной буферной смеси сравнивали два буферных раствора: боратный буфер, pH 9,6 и Tris-буфер, pH 8,6. Время измерения интенсивности хемилюминесцентного сигнала было исследовано в диапазоне 0-30 мин (рис. 2). Сопоставление двух вариантов показало большую стабильность во времени для субстратной смеси, приготовленной на боратном буфере. При этом снижение хемилюминесцентного сигнала было пропорционально снижению фонового сигнала, что делало соотношение  $S$  образца/ $S$  порог. стабильным в течение 3-30 мин. В данной работе измерения интенсивности сигнала проводили через 5 минут.

Определение уровня антител к чЭПО в сыровотках кроликов. На рисунке 3 (А, Б) представле-

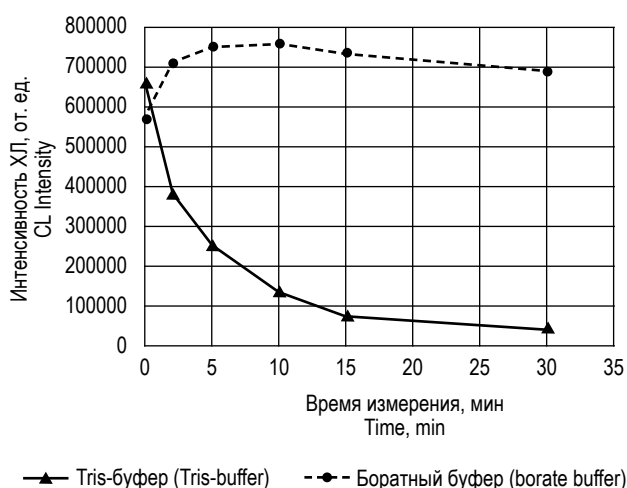
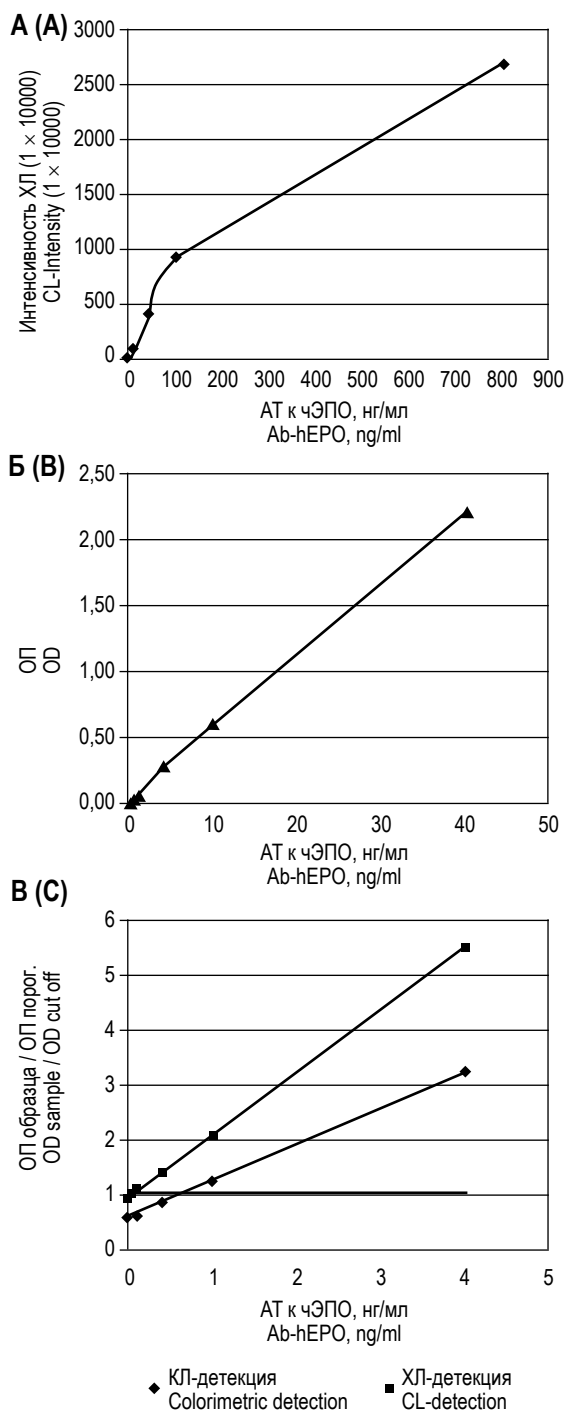


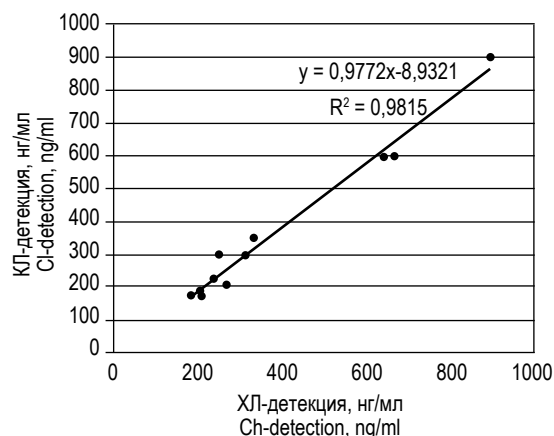
Рисунок 2. Сравнение во времени интенсивности хемилюминесценции при использовании для приготовления субстратной смеси различных буферных растворов

Figure 2. Comparison of buffer solutions for preparation of substrate mixture and intensity in time



**Рисунок 3. Сравнение диапазона калибровочных графиков для ИФА с колориметрической (А) и хемилюминесцентной (Б) детекцией. Сравнение графиков зависимости сигнала от концентрации для ИФА с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией в диапазоне низких концентраций антител с указанием линии отсечения предела обнаружения (В)**

Figure 3. Comparison of the range of calibration graphs for ELISA with colorimetric (A) and chemiluminescent (B) detection. Comparison of graphs of dependence of the signal on the concentration for the ELISA with colorimetric and chemiluminescent detection in the range of low concentrations of antibodies indicating the cut-off line detection limit (C)



**Рисунок 4. Результаты корреляции для двух типов ИФА при определении АТ к чЭПО в сыворотках кроликов**

Figure 4. The results of correlation for the two types of ELISA in detection the antibody to the chEPO in the sera of rabbits

ны зависимости интенсивности детектируемого сигнала от концентрации аффинно очищенных поликлональных антител кролика к эритропоэтину человека в диапазоне 0,08–800 нг/мл для хемилюминесцентной детекции и 0,6–40 нг/мл для колориметрической детекции соответственно. Чувствительность, определенная как концентрация антител к эритропоэтину, при которой отношение сигнала к пороговому значению равнялась единице, составила 0,6 нг/мл при колориметрическом и 0,08 нг/мл при хемилюминесцентном методе детекции, результаты представлены на рисунке 3 (В). Контроль воспроизводимости в рамках одной постановки проводили, определяя концентрацию антител в 3 образцах с различным уровнем антител в восьми повторах, коэффициент вариации при колориметрическом методе детекции составлял 5,5–8%, при хемилюминесцентном – 9–12%.

Исследованы три группы сывороток экспериментальных кроликов при разной дозе и способе введения препаратов. В таблице 1 представлены средние значения индексов позитивности, полученные для исследуемых образцов.

В результате установлено, что для ИФА с хемилюминесцентной детекцией значения индексов позитивности в 1,9–2,6 раза превышали значение аналогичных показателей при проведении колориметрической детекции.

На рисунке 4 показана корреляция содержания антител к эритропоэтину, полученных при проведении ИФА с хемилюминесцентной и колориметрической детекцией и рассчитанных по калибровочным графикам, аналогичным приведенным на рисунке 3 (А, Б). Полученная корреляция выражается линейной зависимостью с коэффициентом детерминации  $R = 0,981$ .

**ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКС ПОЗИТИВНОСТИ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СЫВОРОТОК КРОЛИКОВ ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ (КЛ) И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ (ХЛ) ДЕТЕКЦИИ**

TABLE 1. THE INDEX OF POSITIVITY OF THE ANALYZED SERA OF RABBITS FOR COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT DETECTION

Препарат, доза Drug, dose	КЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Colorimetric average value $\pm \sigma$	ХЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Chemiluminescent average value $\pm \sigma$	р-значение p value
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>2,5 мкг/кг (подкожно)</b> PEG-EPO 2.5 $\mu$ g/kg (subcutaneously) n = 3	2,8 $\pm$ 0,26	5,4 $\pm$ 1,24	0,05
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>5,0 мкг/кг (подкожно)</b> PEG-EPO 5.0 $\mu$ g/kg (subcutaneously) n = 3	5,3 $\pm$ 1,3	12,0 $\pm$ 2,16	0,05
<b>«Мирцера»</b> <b>5,0 мкг/кг (подкожно)</b> "Mircera" 5.0 $\mu$ g/kg (subcutaneously) n = 4	2,1 $\pm$ 0,01	5,4 $\pm$ 0,9	0,05

**Примечание. Достигнутый уровень значимости р указывается для критерия Манна–Уитни в каждой группе животных.**

Note. The achieved significance level p is indicated for the Mann–Whitney test in each group of animals.

**ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКС ПОЗИТИВНОСТИ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СЫВОРОТОК МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ПОДКОЖНОМ И ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ (КЛ) И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ (ХЛ) ДЕТЕКЦИИ**

TABLE 2. INDEX OF POSITIVITY OF THE ANALYZED GUINEA PIG SERA IN SUBCUTANEOUS AND INTRAVENOUS ADMINISTRATION FOR COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT DETECTION

Препарат, доза Drug, dose	КЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Colorimetric average value $\pm \sigma$	ХЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Chemiluminescent average value $\pm \sigma$	р-значение p value
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>2,5 мкг/кг (подкожно)</b> PEG-EPO 2.5 $\mu$ g/kg (subcutaneously) n = 7	0,6 $\pm$ 0,06	1,1 $\pm$ 0,19	0,01
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>5,0 мкг/кг (подкожно)</b> PEG-EPO 5.0 $\mu$ g/kg (subcutaneously) n = 8	1,5 $\pm$ 0,26	8,7 $\pm$ 2,3	0,001
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>2,5 мкг/кг (внутривенно)</b> PEG-EPO 2.5 $\mu$ g/kg (intravenously) n = 6	6,9 $\pm$ 0,45	61,6 $\pm$ 4,6	0,01
<b>ПЭГ-ЭПО</b> <b>5,0 мкг/кг (внутривенно)</b> PEG-EPO 5.0 $\mu$ g/kg (intravenously) n = 7	4,8 $\pm$ 0,69	32,5 $\pm$ 5,8	0,01

**Примечание. См. примечание к таблице 1.**

Note. As for Table 1.

### Определение уровня антител к ЭПО в сыворотках морских свинок

В таблице 2 представлены сравнительные данные по определению индекса позитивности для сывороток, показывающие, что при определении уровня антител к эритропоэтину при проведении ИФА с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией более высокая чувствительность наблюдалась при хемилюминесцентной детекции (табл. 2).

### Обсуждение

Основными преимуществами хемилюминесцентного метода являются широкий динамический диапазон, высокая чувствительность и полная совместимость с протоколом твердофазного иммуоферментного метода, широко используемого в клинической лабораторной диагностике. В качестве метки в иммуоферментном анализе широко применяют пероксидазу хрена, методы получения и стабилизации конъюгатов с которой хорошо изучены. Пероксидазу хрена чаще всего определяют колориметрически, но изучено также определение пероксидазы с помощью хемилюминесцентной реакции в системе люминол – пероксид водорода, усиленной фенольными соединениями. В настоящей работе проведено сравнение методов выявления специфических IgG антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуоферментным методом с применением колориметрической детекции хемилюминесцентной детекции, в системах 3,3',5,5'-тетраметилбензидин – пероксид водорода и люминол – пероксид водорода соответственно. Оптимизация состава субстратной смеси и условий проведения регистрации интенсивности хемилюминесценции позволили повысить чувствительность выявления специфических IgG-антител к эритропоэти-

ну человека. Так, предел обнаружения аффинно очищенных поликлональных антител кролика чЭПО был уменьшен в 4,5 раза, а диапазон измерений расширен более чем в 20 раз при замене колориметрической детекции на хемилюминесцентную. При выявлении специфических IgG-антител к эритропоэтину человека в сыворотках крови экспериментальных животных – кроликов и морских свинок – методом с хемилюминесцентной детекцией показано достоверное увеличение чувствительности, определяемое при сравнении индексов позитивности анализируемых образцов: во всех группах образцов наблюдалось увеличение индекса позитивности в 1,8-8,9 раза. В группе морских свинок с введением препарата эритропоэтина в дозировке 2,5 мкг/кг (подкожно) антитела были обнаружены только при ИФА с хемилюминесцентной детекцией.

При хемилюминесцентном методе детекции сопоставимая чувствительность была получена при использовании приготовленной в лаборатории субстратной смеси, а также коммерческой буферной субстратной смеси SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific.

Таким образом, хемилюминесцентный метод детекции с использованием системы люминол–пероксид водорода в присутствии 4-йодофенола повысил чувствительность выявления IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуоферментным методом.

### Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность биофармацевтической компании ООО «ФОРТ» за предоставленный эритропоэтин рекомбинантный человеческий и сыворотки экспериментальных животных.

### Список литературы / References

1. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.*, 2013, Vol. 5, no. 6, pp. 539-542.
2. Kamidate T., Maruya M., Tani H., Ishida A. Application of 4-iodophenol-enhanced luminolchemiluminescence to direct detection of horseradish peroxidase encapsulated in liposomes. *Anal Sci.*, 2009, Vol. 9, no. 25, pp. 1163-1166.
3. Lonshakov D.V., Sheremet'ev S.V., Belosludtseva E.M., Korovkin S.A., Semchenko A.V., Katlinskij A.V. Synthesis of 4-aminobenzoic acid esters of polyethylene glycol and their use for pegylation of therapeutic proteins. *RSC Adv.* 2015, Vol. 5, no. 53, pp. 42903-42909.
4. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A., Goldsmith D.J., Schellekens H., Ebbers H., Jelkmann W., London G., Casadevall N., Hörl W.H., Kemeny D.M., Pollock C. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 8, no. 81, pp. 727-732.
5. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F., Combe C., London G.M., di Paolo S., Kribben A., Fliser D., Messner H., McNeil J., Stevens P., Santoro A., de Francisco A.L., Percheson P., Potamianou A., Foucher A., Fife D., Mérit V., Vercammen E. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 3, no. 30, pp. 451-460.
6. Wang F., Driscoll D., Richardson D., Ambrogely A. The comparison of chemiluminescent- and colorimetric-detection based ELISA for Chinese Hamster ovary host cell proteins quantification in biotherapeutics fengqiang. *J. Bioprocess. Biotechniq.*, 2013, Vol. 3, no. 3, pp. 1-7.

7. Wang W., Lu Y., Zhang S., Wang S., Cao P., Tian Y., Zhang X. Development of a chemiluminescent imaging assay for the detection of anti-erythropoietin antibody in human sera. *Luminescence*, 2009, Vol. 1, no. 24, pp. 55-61.
8. Wayne O., Scalarone H., Scalarone G.M. Comparison of colorimetric and chemiluminescent ELISAs for the detection of antibodies to *Blastomyces dermatitidis*. *J. Med. Biol. Sci.*, 2009, Vol. 3, no. 1, 2009, pp. 1-6.
9. Yang L., Jin M., Du P., Chen G., Zhang C., Wang J. Jin F., Shao H., She Y., Wang S., Zheng L., Wang J. Study on enhancement principle and stabilization for the luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP chemiluminescence system. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0131193. doi: 10.1371/journal.pone.0131193.

---

**Авторы:**

**Кудряшова А.М.** — младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Михайлова Н.А.** — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Борисова О.В.** — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Authors:**

**Kudryashova A.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Mikhailova N.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Borisova O.V.**, PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 19.03.2018  
Принята к печати 22.03.2018

Received 19.03.2018  
Accepted 22.03.2018