



УДК 577.15.08

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИТЕЛ К ПОЛИСАХАРИДНОМУ АНТИГЕНУ ПО ИХ АФФИННОСТИ И ЭПИТОПНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

© 1997 г. Л. В. Козлов[#], Т. Н. Баталова, Т. В. Фаддеева, Р. Л. ПануринаМосковский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского,
125215, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Поступила в редакцию 10.11. 96 г. Принята к печати 26.02.97 г.

Использование уравнения Лэнгмюра для обсчета данных твердофазного иммуноферментного метода анализа (сандвич-варианта) позволяет придать физический смысл параметрам оптимизации кривой титрования антиген–антитело: максимальный ответ, характеризующий предельное связывание, адекватен насыщению всех эпитопов антигена; концентрация, при которой достигается половина максимального ответа, соответствует константе диссоциации иммунного комплекса, т.е. усредненной аффинности антител. Алгоритм опробован для систем, в которых на подложке были сорбированы антитела к IgE и IgD, а связывавший антиген определяли с помощью антител, конъюгированных с пероксидазой. Найдено хорошее соответствие экспериментальных точек теоретической кривой и разумные величины констант аффинности. В другой системе изучали связывание специфических антител IgG, IgM, IgA с полисахаридом *Neisseria meningitidis*, серогруппа А, при проведении испытаний вакцины. Структурная простота молекулы антигена позволила предположить наличие двух главных эпитопов и выявить динамику образования антител к ним.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, алгоритм программы, эпитопы, полисахарид, *Neisseria meningitidis*, серогруппа А.

Иммунохимические методы определения различных веществ, в особенности после создания гибридомной технологии получения моноклональных антител и разработки иммуноферментных методов анализа, постепенно вытесняют традиционные подходы благодаря своей высокой специфичности и чувствительности. Однако иммуноферментные методы, завоевавшие большую популярность, обнаруживают неожиданные трудности при количественной оценке результатов, что часто сводит на нет все их преимущества [1]. Иммуноферментному анализу (ИФА) посвящена масса публикаций. Состояние проблем теории и практики иммуноферментного анализа рассмотрено в обзорных работах [2, 3].

Нередко ИФА используется для качественной или полуколичественной оценки содержания соединения в образце [2]. При определении по стандартной кривой титрования рекомендуется проводить анализ исследуемого образца в нескольких разведениях и использовать для расчета концентрации то значение оптического поглощения, которое ближе всего к середине линейного участка стандартной кривой [2]. Примеры мате-

матического описания кривых зависимости “концентрация – ответ” большей частью основывались на эмпирическом подходе, т.е. математические модели в принципе оказывались лишенными физического смысла.

Одной из основополагающих работ, посвященных математической обработке данных ИФА, была статья Эллериха и др. [4], в которой рассмотрены пять различных моделей и выбрана одна из них – четырехпараметровая, которая наиболее широко используется в настоящее время [4–7]:

$$Y = \frac{a - d}{1 + (X/c)^b} + d, \quad (1)$$

где Y – измеряемый сигнал; X – определяемая концентрация; a – уровень сигнала при концентрации, равной нулю, т.е. базовая линия или фон; d – уровень сигнала при бесконечной концентрации, т.е. максимальный ответ при насыщающей концентрации; b – фактор наклона, т.е. тангенс угла наклона линеаризованного логарифмированием уравнения (другое название – “глубина кривизны”, если уравнение выражено в дополулогарифмической форме и имеет вид сигмоиды); c – концентрация, при которой наблюдается сигнал, равный половине максимального за вычетом фона.

[#]Автор для переписки (факс: (095) 452-18-30).

Таблица 1. Значения коэффициента b при определении иммуноглобулинов

Образец	b	R
IgD (стандарт)	1.073 ± 0.025	0.999
IgD в сыворотке	1.060 ± 0.058	0.994
IgE в сыворотке 1	0.960 ± 0.039	0.995
IgE в пуле сывороток	0.919 ± 0.052	0.992
IgE в сыворотке 2	1.910 ± 0.038	0.996

Данная модель, предложенная для описания кривых, имеющих в полулогарифмической форме вид сигмоиды, требует оптимизации по четырем параметрам [7]. В связи с этим модель кажется пригодной для описания данных, получаемых ИФА. Однако ряд обстоятельств заставляет с осторожностью относиться к такой модели. Прежде всего это касается фактора b , математически аналогичного коэффициенту Хилла [8]. Физический смысл параметра b остается неясным, и, скорее всего, отличие этого коэффициента от единицы свидетельствует о наличии каких-то артефактов. Подбор в ходе оптимизации параметров a и b для наилучшего соответствия реальной системы эмпирическому уравнению вносит сомнения в сохранении этих параметров при переходе от стандартной (калибровочной) кривой к опытным образцам. Так, если мы получили стандартную кривую для чистого препарата, например какого-либо белка сыворотки крови, и определяем его концентрации в конкретных сыворотках, то нет уверенности в том, что параметры математической модели во всех случаях будут одинаковыми, что вносит сомнения в правильность определения концентраций в исследуемых образцах.

Были разработаны иммуноферментные тест-системы сандвич-типа для определения IgE и IgD на основе поликлональных антител к этим белкам и их конъюгатов с пероксидазой. Определены величины оптического поглощения при 492 нм для оценки скорости пероксидазной реакции ($A_{изм}$) и найдена ее максимальная величина в условиях насыщающей концентрации антигена ($A_{макс}$).

Для оценки числа параметров, необходимых для оптимизации получаемых данных по теоретической кривой, была проведена оценка фактора наклона b (коэффициента Хилла) по линейному уравнению

$$\ln\left(\frac{A_{изм}}{A_{макс} - A_{изм}}\right) = b \ln D + q, \quad (2)$$

где D – фактор разбавления пробы, а q – отрезок, отсекаемый этой прямой на оси ординат [4].

Значения коэффициента Хилла (b), полученные по уравнению 2 из данных определения IgE и IgD в сыворотках и стандарте IgD, равны 1 при

хорошем соответствии линейному уравнению (табл. 1). Таким образом, нет необходимости во включении в число оптимизируемых параметров коэффициента b . Данный критерий (равенство тангенса угла наклона единице) в работе Паркера [9] принят для оценки гомогенности антител. Таким образом, несмотря на применение поликлональных антител в качестве посадочных и в составе конъюгатов, этих антитела выступали как гомогенные.

Строгий анализ уравнения 1 показывает, что оно включает в скрытом виде зависимость базовой линии от концентрации определяемого вещества. Допущение независимости базовой линии позволяет не вводить ее значение в уравнение и вычитать уровень фона автоматически при измерении путем соответствующей настройки прибора.

При таком упрощении исходное четырехпараметровое уравнение превращается в двухпараметровое:

$$Y = \frac{dX}{c + X}, \quad (3)$$

т.е. в изотерму Лэнгмюра, аналогичную уравнению Михаэлиса–Ментен, параметры которого имеют тот же смысл: d – максимально возможный ответ, наблюдающийся при насыщении, c – константа диссоциации продуктивного комплекса.

Определение параметров в уравнении Михаэлиса–Ментен предпочтительно проводить широко распространенным в настоящее время в энзимологии итерационным методом Уилкинсона [10], позволяющим учитывать “вес” каждого значения, т.е. фактически проводить оптимизацию по гиперболе изотермы, а не по линейной анаморфозе. Ранее этот метод в его компьютерном воплощении был с успехом применен для описания аналогичной математической ситуации [11].

Реализация этого алгоритма в виде программы для ЭВМ позволила математически обработать полученные зависимости измеряемых значений оптического поглощения от разбавления экспериментальных проб при титровании IgD и IgE в стандартах и сыворотках по методу твердофазного ИФА. Как следует из рис. 1, экспериментальные точки достаточно хорошо соответствуют теоретическим кривым, построенным в результате машинной обработки. Величины отклонения экспериментальных точек от теоретической кривой (рис. 2) носят случайный характер, что свидетельствует об объективности теоретической кривой. Как следует из этих графиков, концентрации титруемых антигенов можно определять в широком диапазоне, а не только на линейном участке соответствующей анаморфозы. Это находит подтверждение в данных по определению концентраций антигенов с использованием описанного мето-

да обработки результатов при 60-кратном изменении концентраций (табл. 2).

Параметры, по которым происходит оптимизация полученных значений, как уже указывалось выше, имеют реальный физический смысл: это максимально достижимый ответ при насыщении титруемым антигеном и константа диссоциации комплекса антиген-антитело. Второй параметр позволяет оценить аффинность антител по величине, обратной константе диссоциации. Так, в рассмотренных выше примерах были определены следующие константы аффинности: для стандарта IgD полученные антитела обладали аффинностью $(1.5 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, а для стандарта IgE – $(4.7 \pm 0.5) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Возможности структурно-эпитопной характеристики антител с помощью такого способа об-счета данных ИФА продемонстрированы при изучении иммунного ответа к менингококковому полисахариду серогруппы А (ПС-А), входящему в состав комплексной вакцины. Определено относительное количество антител IgG, IgM, IgA до вакцинации и через 1 и 6 мес после нее, а также относительная полнота ответа по количеству антигенных детерминант (эпитопов) на молекуле антигена, к которым эти антитела вырабатываются, и относительные аффинности антител к разным эпитопам (табл. 3).

В связи с тем что в качестве стандарта был выбран пул 20 сывороток, представляющих некий усредненный иммунный ответ, все полученные в работе данные были рассчитаны в процентах к этому стандарту. Это касалось количеств синтезируемых организмом антител, максимального связывания этих антител с антигеном (эпитопным насыщением) и констант диссоциации комплексов антиген-антитело (обратным константам аффинности).

В табл. 3 приведены данные по уровню антител классов IgG, IgA и IgM против менингококкового полисахарида серогруппы А, их максимальному связыванию с антигеном и усредненным константам диссоциации соответствующих комплексов антиген-антитело для 10 человек до вакцинации, через 1 и 6 мес после введения вакцины, содержащей менингококковый полисахарид А. Если по этим данным для каждого класса специфических антител построить зависимость констант диссоциации от доли связанных эпитопов антигена, то получаются графики кластерных скоплений точек. Наиболее четко это видно на примере IgG-антител (рис. 3).

В связи с этим интересно рассмотреть структуру полисахарида А, являющегося гомополимером из 93 остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-маннопиранозы, соединенных 1-6- α -фосфодиэфирной связью, причем на 72% он, кроме того, *O*-ацетилован [12, 13] (рис. 4). Таким образом, в простейшем варианте можно предположить, что по-

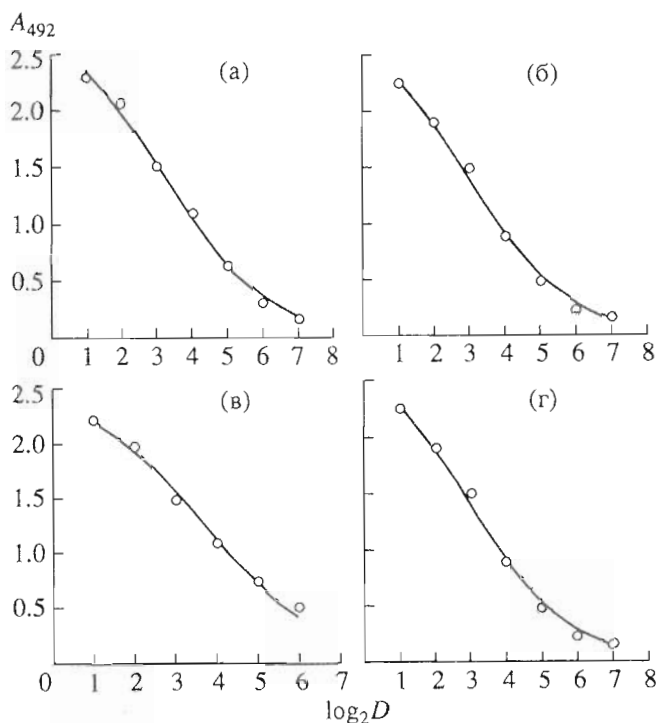


Рис. 1. Зависимости измеряемых значений поглощения (A_{492}) в пероксидазной реакции от разбавления экспериментальных проб (D в логарифмической шкале) при титровании IgD (а, б) и IgE (в, г) в стандартах (а, в) и сыворотках (б, г). На графиках показаны экспериментальные точки и теоретические кривые, построенные по уравнению 3.

лисахаридный антиген содержит два эпитопа: *O,N*-диацетилованный остаток сахара (72%) и *N*-ацетилованный (28%). При этом скорее всего второй эпитоп должен быть более “сильным”, т.е. прочнее связываться с антителами, поскольку его функциональная группа (гидроксил) свободна. На рис. 3 видно, что кластеры точек примерно соответствуют абсциссе 28, 72 и 100%, что может рассматриваться как соответствие: синтеза антител к первому или второму эпитопам и двум вместе. Действительно, наилучшее связывание антител (меньшая константа диссоциации) наблюдается для эпитопа с содержанием около 28%. Одновременное насыщение двух эпитопов, вероятно, более затруднено, что приводит к дальнейшему повышению константы.

Анализ данных табл. 3 позволяет по характеру иммунного ответа условно разбить испытуемых на три группы (рис. 5): в первую входит только один человек (6-й испытуемый), во вторую – 4 человека (1, 3, 5 и 9-й), а в третью группу – 5 человек (2, 4, 7, 8 и 10-й).

Первая группа отличается отсутствием ответа на вакцинацию по всем трем иммуноглобулинам. Для второй группы характерно, что до вакцинации имелись IgG-антитела только к одному (веро-

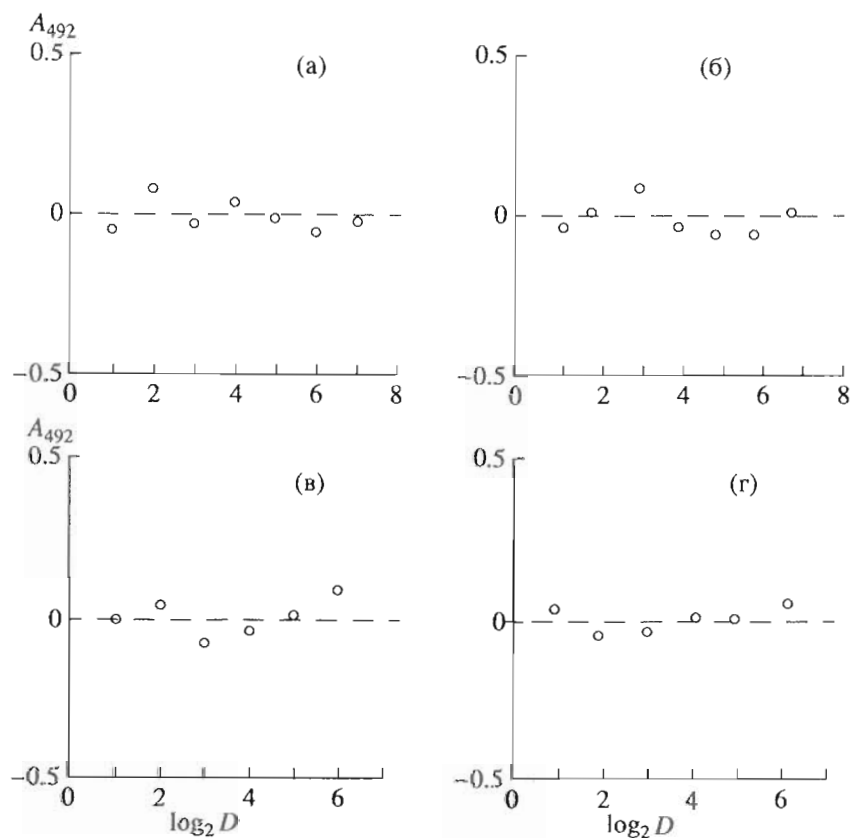


Рис. 2. Отклонения экспериментальных точек от теоретических кривых рис. 1 в стандартах (а, в) и сыворотках (б, г).

ятно, сильному) эпитопу, через месяц после вакцинации они образовались ко второму эпитопу, а к первому исчезли. Через полгода все классы антител дали полный ответ. В третьей группе иммунный ответ наблюдали по всем классам антител через месяц и через полгода.

Полученная картина иммунного ответа интересна в двух аспектах: 1) наличие во всех группах испытуемых до вакцинации антител IgG класса

Таблица 2. Определение методом ИФА IgE и IgD (нг/мл) в образцах с известным их содержанием

IgE		IgD	
Концентрация	Определено	Концентрация	Определено
3.0	3.0	6.9	7.6
5.5	5.8	14	11
11	11	17	14
12	14	28	24
22	20	35	34
24	24	55	53
48	49	69	73
88	69	138	133
96	89	221	238
189	208	443	448

только к одному (вероятно, наиболее сильному) эпитопу; что касается других классов антител, то и они характеризуются неполным эпитопным ответом; 2) парадоксальное исчезновение изначально имевшихся IgG-антител к сильному эпитопу через месяц после вакцинации во второй группе испытуемых и появление ответа ко второму (слабому) эпитопу. Для этой группы характерно также практическое отсутствие IgA-антител до вакцинации и полный ответ уже через месяц после вакцинации. В связи с этим можно предположить, что имевшиеся до вакцинации антителообразующие клетки, продуцирующие IgG-антитела к сильному эпитопу, после стимуляции антигеном при вакцинации переключаются на синтез IgA-антител [14].

Другое возможное объяснение этого парадокса – феномен так называемого “иммунологического паралича”, наблюдаемого при введении неметаболизирующего антигена, как правило полисахарида [15]. Этот феномен может наблюдаться в виде расщепленной толерантности, когда индуцируется подавление иммунного ответа только к одному эпитопу [15]. Вводимые при вакцинации весьма малые дозы антигена для некоторых вакцинируемых могли оказаться достаточными для создания временной толерантности к эпитопу, к которому изначально уже имелись IgG-антитела.

Таблица 3. Иммунный ответ на вакцинацию менингококковым полисахаридом серогруппы А через 1 и 6 мес и состояние до вакцинации по уровню антител IgG, IgM и IgA, количеству эпитопов и константам диссоциации ($K_{дис}$) (% к стандарту)*

№	Кол-во антител			Кол-во эпитопов			$K_{дис}$		
	0	1 мес	6 мес	0	1 мес	6 мес	0	1 мес	6 мес
IgG-антитела									
1	7	70		30	69		22	51	
2	5	68	46	12	91	115	4	85	169
3	3	50	52	24	66	83	8	35	72
4	5	147	60	24	97	89	10	94	80
5	2	54		15	67		19	34	
6	11	12	4	18	23	30	12	17	21
7	2	92	125	32	98	73	15	103	47
8	10	126	115	16	86	112	9	80	109
9	6	60	92	25	69	96	10	51	86
10	5	60	122	33	93	98	18	81	87
IgM-антитела									
1	25	200		53	103		62	105	
2	23	90	47	43	91	93	30	77	94
3	10	75	32	49	89	85	33	82	72
4	20	220	109	77	107	106	66	119	124
5	7	122		30	84		22	62	
6	15	16	13	75	68	73	77	66	66
7	29	130	77	84	89	93	87	77	81
8	10	66	64	39	77	60	29	58	35
9	16	125	170	75	110	96	65	126	86
10	18	170	127	67	106	104	60	119	111
IgA-антитела									
1	5	300		33	164		32	215	
2	1	39	26	—	86	95	—	69	90
3	1	50	38	—	79	70	—	71	58
4	4	180	49	11	98	68	7	102	50
5	0	149		—	101		—	98	
6	1	4	2	40	14	18	38	10	12
7	3	109	109	19	106	90	10	117	77
8	1	89	126	26	104	116	24	111	151
9	0	37	183	—	97	103	—	71	109
10	0	31	34	—	79	45	—	72	36

* В качестве стандарта выбран пул 20 сывороток. Пропуск — отсутствие взятия крови на анализ; прочерк — величина, близкая к нулю.

Таким образом, иммуноферментный анализ с использованием предложенной обработки полученных данных позволяет не только оценить количество антител, их аффинность, но и высказать предположения относительно структуры эпитопов антигена, к которым эти антитела образуются.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе применяли компьютерную программу для ИФА, реализуемую ООО "Кипко" при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 96-луночные

плоскостные микропанели (Nunc, Дания), твин 20 (Sigma, США), пероксидазу хрена ИПО "Биохим-реактив" (Г. Олайне, Латвия), остальные реактивы — отечественного производства качества не ниже ч. д. а.

Козьи IgG-антитела к IgG, IgM, IgA, IgD и IgE человека и конъюгаты этих антител с пероксидазой получали традиционными методами [16–18].

Стандарт IgD — Fc-фрагмент IgD производства Behringwerke AG (Марбург, Германия), стандарт IgE — препарат Ставропольского НИИ вакцин и сывороток.

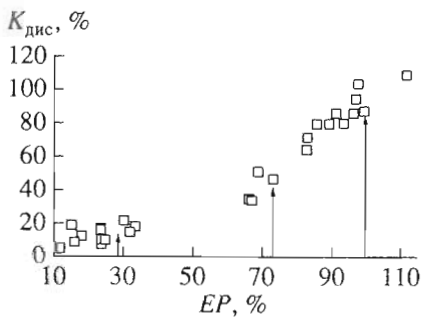


Рис. 3. Зависимость констант диссоциации ($K_{\text{дис}}$) комплекса антиген-антитело от доли эпитопного насыщения (EP) антигена IgG антителами к менингококковому полисахариду А.

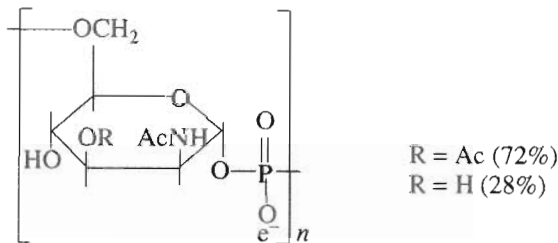


Рис. 4. Структура полисахарида А менингококка [12, 13].

Высокоочищенный полисахаридный антиген менингококков группы А (ПС-А), полученный по методу Готшлиха [19], содержащий примеси белка и нуклеиновых кислот соответственно в количествах 0.75 и 0.56%, был любезно предоставлен В.И. Кувакиной (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).

Антитела к ПС-А выделяли из кроличьих гипериммунных антисывороток (НИИВС им. Пастера, Санкт-Петербург).

Определение IgD и IgE в образцах сывороток. В лунки микропанелей вносили по 100 мкл раствора IgG-антител (10 мкг/мл) к IgD или IgE в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.5, и инкубировали 18 ч при 4°C. Содержимое лунок

выливали и микропанели трижды промывали 0.01 М фосфатным буфером, pH 7.4, содержащим 0.15 М NaCl и 0.05% твин 20 (буфер А). Во все лунки вносили по 100 мкл того же буфера и проводили раститровку стандартных растворов, внося в первую лунку соответствующего ряда 100 мкл пробы в исходном разведении и перенося по 100 мкл образующейся смеси в следующую лунку, получая таким образом ряд двукратных разведений. Остальные лунки, кроме контрольных, заполняли опытными образцами в рабочем разведении. В контрольные лунки вносили растворы, не содержащие титруемого антигена. После инкубации в течение 1 ч при 37°C содержимое лунок выливали и планшеты трижды промывали, как описано выше. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора конъюгата антител (анти-IgD или анти-IgE) с пероксидазой в рабочем разведении, инкубировали 1 ч при 37°C и вновь отмывали. В каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного раствора (10 мг *o*-фенилендиамина в 25 мл 0.1 М цитратного буфера, pH 5.0, и 5 мкл 3% перекиси водорода) и инкубировали 30 мин в темноте при ~20°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 14% серной кислоты. Измерение поглощения при 492 нм проводили на ультрамикрoаналитической системе SUMA-121 (Центр по иммуноисследованиям, Гавана, Куба).

Вакцинацию мужчин-добровольцев 18–20 лет проводили путем однократного введения вакцины, содержащей 50 мкг ПС-А на 1 дозу. Исследовали содержание специфических IgG-, IgM- и IgA-антител против полисахарида серогруппы А до вакцинации и через 1 и 6 мес. Специфическое антитела определяли с помощью иммуноферментного анализа [20].

ИФА специфических IgG-, IgM- и IgA-антител против ПС-А в образцах сывороток. В лунки микропанелей вносили по 100 мкл раствора IgG-фракции антител к ПС-А (1 мкг/мл) в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.5, и инкубировали 16 ч при 4°C. Содержимое лунок выливали и микропанели трижды промывали буфером А. Во все лунки вносили по 100 мкл раствора ПС-А

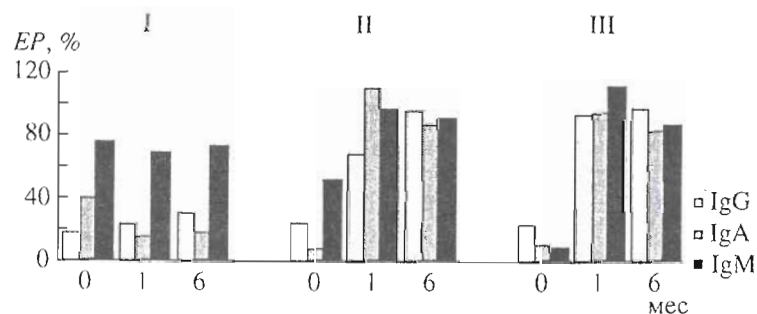


Рис. 5. Динамика эпитопного насыщения для IgG-, IgA- и IgM-антител до и через 1 и 6 мес после вакцинации в трех группах испытуемых.

(0.1 мкг/мл) в том же буфере и инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки исследуемые сыворотки раститровывали, внося в первую лунку соответствующего ряда 100 мкл пробы в исходном разведении и перенося по 100 мкл образующейся смеси в следующую лунку, получая таким образом ряд двукратных разведений. Исследуемые сыворотки раститровывали, начиная с разведения 1 : 2, а стандартную сыворотку – с разведения 1 : 8.

Стандартом служил пул сывороток крови 20 человек, взятых через 1 мес после однократного введения вакцины ПС-А. В контрольные лунки вносили растворы, не содержащие титруемых сывороток. После инкубации в течение 1 ч при 37°C содержимое лунок выливали и планшеты трижды промывали, как описано выше. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора конъюгата антител (анти-IgG, анти-IgA или анти-IgM) с пероксидазой в рабочем разведении, инкубировали 1 ч при 37°C и вновь отмывали. Далее проводили ферментативную реакцию как описано выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pesce A.J., Michael J.G.* // *J. Immunol. Methods*. 1992. V. 150. P. 111–119.
2. *Кэтти Д., Райсундалия Ч.* // *Антитела. Методы*. Кн. 2 / Ред. Д.М. Кэтти. Пер. с англ. М.: Мир, 1991. С. 152–238.
3. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.В., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. школа, 1991.
4. *Oellerich M., Haeckel R., Haindl H.* // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1982. V. 20. P. 765–772.
5. *Кэрстак Э.* // *Бюл. ВОЗ*. 1985. Т. 6. С. 118–139.
6. *De Lean A., Munson P.J., Rodbard D.* // *Am. J. Physiol.* 1978. V. 235. P. E97–E102.
7. *Ritchie D.G., Nickerson J.M., Fuller G.M.* // *Analyt. Biochem.* 1981. V. 110. P. 281–290.
8. *Hill F.V.* // *J. Physiol.* 1910. V. 40. P. IV–VII.
9. *Parker C.W.* Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. Prentice-Hall, Inc. Engelwood Cliffs. New Jersey, 1976. P. 118.
10. *Wilkinson G.M.* // *Biochem. J.* 1961. V. 80. P. 324–332.
11. *Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сумовская Н.С.* // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. С. 762–768.
12. *Liu T.Y., Gotschlich E.G., Jonssen E.K., Wysocki J.R.* // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. P. 2849–2858.
13. *Bundle D.R., Smith I.C.P., Jennings H.J.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 2275–2281.
14. *Hammarstrom L., Mellstedt H., Person M.A., Smith C.L., Ahre A.* // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1984. V. C92. P. 207–211.
15. *Сискин Г.У.* // *Иммунология*, в 3-х т., пер. с англ. / Ред. У. Пол. М.: Мир, 1988. Т. 2. С. 362–395.
16. *Стюев К.Г., Панурина Р.Л., Гаврилова Е.М., Шаханина К.Л.* // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1979. № 11. С. 42–47.
17. *Wilson M.B., Nakane P.K.* // *Immunofluorescence and Related Staining Techniques* / Eds W. Knopp, K. Holubar, G. Wick. Amsterdam: Elsevier, 1978. P. 215–219.
18. *Getty D., Raykundalia C., Houba V.* // *WHO IMM/PIR*. 1983. № 83.1.
19. *Gotschlich E.G., Rey M., Etienne J., Saubern W.R., Triau R., Cvjetanovic B.* // *Progr. Immunobiol. Standart.* Basel: Karger, 1972. V. 5. P. 485–491.
20. *Beuvery E.C., Rossum van F., Nagel J.* // *Infect. Immun.* 1982. P. 15–22.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Characterization of Affinity and Epitope Specificity of Antibodies to a Polysaccharide Antigen

L. V. Kozlov, T. N. Batalova, T. V. Faddeeva, and R. L. Panurina

*Gabricheskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125215 Russia*

Abstract—The use of the Langmuir equation for processing ELISA data (the sandwich variant) helped to ascribe a physical sense to the parameters of the optimization of the antigen–antibody titration curve: the maximum response that characterizes complete binding corresponds to the saturation of all epitopes of the antigen, and the concentration at which half of the maximum response is attained corresponds to the dissociation constant of the immune complex, i.e., to the average affinity of the antibodies. The algorithm was tested for systems in which antibodies against IgE and IgD were sorbed on a support, and the antigen bound was determined by the antibodies conjugated with peroxidase. A good fit of the experimental and theoretical curves and reasonable values for the affinity constants were found. In another system, the binding of specific IgG, IgM, and IgA antibodies with the polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serotype A was studied during vaccine testing. The structural simplicity of the antigen molecule made it possible to suggest the presence of two main epitopes and to reveal the dynamics of formation of the antibodies to them.

Key words: ELISA; program algorithm; epitopes; *Neisseria meningitidis* serotype A, polysaccharide