

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*М.А.Смердова, М.Л.Маркелов,
А.Е.Гущин, А.Е.Судьина,
А.В.Шишова, Г.А.Шипулин*

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММУНОЧИ- ПА ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Разработка тест-системы на основе иммуночипа для выявления иммуноглобулинов класса G к *Treponema pallidum*. **Материалы и методы.** Рекомбинантные антигены *T.pallidum* Tr47, Tr17, Tr15, TmpA были отдельно иммобилизованы на активированные слайды в виде индивидуальных спотов (пятен). Для выявления специфических антител к возбудителю сифилиса в сыворотке крови человека проводили непрямой иммунофлуоресцентный анализ на иммуночипе с помощью антивидовых антител к IgG человека. Результаты тестирования сывороток считывали с помощью флуоресцентного сканера. Для каждого антигена рассчитывали критический уровень сигнала флуоресценции и коэффициент позитивности. Оценку чувствительности и специфичности иммуночипа проводили на клиническом материале из 400 образцов сывороток крови, содержащих и не содержащих антитела к *T.pallidum*. **Результаты.** Из 200 положительных образцов сывороток крови 5 были интерпретированы как неопределенные, так как в иммуночипе регистрировали позитивные значения только по антигену Tr17, что было сопоставимо с результатами в иммуноблоттинге. Для остальных 195 сывороток крови получен положительный спектр антител к двум и более антигенам. Специфичность тест-системы на основе иммуночипа составила 100%. **Заключение.** Разработана экспериментальная тест-система для дифференциальной серологической диагностики сифилиса на основе иммуночипа. По чувствительности и специфичности данная тест-система сопоставима с тест-системами на основе ИФА.

Журн. микробиол., 2008, № 6, С. 54—58

Ключевые слова: иммуночип, сифилис, иммуноферментный анализ, реакция пассивной гемагглютинации, иммуноблоттинг

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование диагностики сифилиса по-прежнему актуально [4]. Широко используется в качестве подтверждающего теста при диагностике инфекционных заболеваний, в том числе и при ранней, диф-

*M.A.Smerdova, M.L.Markelev,
A.E.Gushchin, A.E.Sudyina,
A.V.Shishova, G.A.Shipulin*

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL TEST- SYSTEM ON THE BASIS OF IMMUNOCHIP FOR SYPHILIS SERODIAGNOSTICS

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. Development of test-system on the basis of immunochip for detection of IgG to *Treponema pallidum*. **Materials and methods.** Recombinant *T.pallidum* antigens Tr47, Tr17, Tr15, TmpA were separately immobilized on activated slides as individual spots. The specific antibodies to *T.pallidum* in human serum were detected by indirect immunofluorescent assay on the immunochip using anti-species antibodies to human IgG. Fluorescent scanner was used to read results of testing. For each antigen threshold level of fluorescent signal and positivity coefficient were calculated. Assessment of specificity and sensitivity of the immunochip was performed on 400 human serum samples containing or not-containing antibodies to *T.pallidum*. **Results.** From 200 positive serum samples 5 were interpreted as inconclusive because positive results on antigen Tr17 only were registered that was comparable with the results of immunoblotting. For each other 195 serum samples, positive result on 2 or more antigens was obtained. Specificity of the immunochip-based test-system was 100%. **Conclusion.** Experimental immunochip-based test-system for differential serologic diagnostics of the syphilis was developed. Its sensitivity and specificity are comparable with that of ELISA-based test-system.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 6, P. 54—58

Key words: immunochip, syphilis, enzyme-linked immunosorbent assay, passive hemagglutination reaction, immunoblotting

ференциальной и ретроспективной диагностике сифилиса иммуноблоттинг [1, 3, 10, 12]. Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя проводить анализ спектра антител в динамике. В то же время, метод имеет ряд

ограничений, прежде всего длительное время анализа, высокую стоимость исследования, низкую производительность из-за отсутствия специализированного оборудования. В связи с этим, актуально создание тест-систем нового поколения, обладающих всеми преимуществами иммуноблоттинга и обеспечивающих высокую производительность анализа.

В последнее десятилетие существенное развитие получила технология анализа сложных биологических систем с помощью так называемых биочипов. При конструировании биочипов сочетаются принцип миниатюризации и многофакторного анализа. Принцип миниатюризации, реализованный в биочипах, приводит к снижению себестоимости анализа и повышению производительности исследований.

Биочип, как правило, представляет собой слайд-пластинку размером 25x75 мм с фиксированными на его поверхности в виде индивидуальных микроочек (диаметр от 20 до 500 микрон) образцами биологически активных препаратов. Современные технологии микропечати позволяют наночипу и иммобилизовать на поверхности биочипа десятки тысяч индивидуальных образцов нуклеиновых кислот, белков, пептидов, полисахаридов, культур клеток, микроорганизмов и др. Практически любые субстанции (сыворотка, цельная кровь, ликвор и др.) после несложной предварительной обработки могут быть подвергнуты анализу с помощью биочипа [5, 11]. Для этого анализируемые препараты в жидком виде наносят на поверхность биочипа, и регистрируются межмолекулярные взаимодействия на поверхности биочипа с помощью флуоресцентных, хемилюминесцентных или масс-спектрометрических методов [7].

Несмотря на высокую эффективность в молекулярной биологии, доля «белковых» биочипов (иммуночипов), используемых в практической медицине, пока незначительна [9, 14].

Цель работы — разработка тест-системы на основе иммуночипа для выявления IgG к *T.pallidum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомбинантные белки *T.pallidum* Tr47, Tr17, Tr15, TrpA были получены с помощью стандартных генно-инженерных методик [2]. Очистку белков проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и гель-электрофореза. Чистота антигенов составила не менее 98%.

Для изготовления биочипов рекомбинант-

ные антигены были отдельно сорбированы на активированные слайды (CSS-100 Silylated Slides фирмы «CEL, Inc.», США) с помощью робота для контактной микропечати «ХастII» фирмы «LabNext», США. Каждому антигену соответствовало индивидуальное пятно диаметром 0,35 мм. Антигены сорбировали в двух повторах с использованием буфера для печати (1xPBS; 5% глицерина; 0,01% твин-20) в конечной концентрации 1 мг/мл. Для контроля «пришивки» антигенов в буфер для печати добавляли БСА, модифицированный флуоресцентным красителем Cy5. При печати набор антигенов группировали в виде 16 идентичных зон на одном слайде (25x75 мм) с расстоянием 9 мм между центрами зон, т.е. один слайд рассчитан на тестирование 16 образцов. Для исключения слияния образцов сыворотки от разных пациентов слайд фиксировали в специальных рамках и держателе фирмы «Whatman» (кат. № 10486046, 10486001), разделяющих зоны при проведении анализа. Сорбцию антигенов проводили в течение 16 — 20 ч при 23 — 25°C. Слайды после сорбции обрабатывали 0,2% раствором казеина в течение 1 ч при 23 — 25°C, затем высушивали в токе теплого воздуха.

Для исключения ошибок при печати и ошибок оператора при постановке анализа на слайды в пределах каждой зоны были включены следующие контроли: сорбционный буфер для контроля качества печати (контроль 1); IgG человека для контроля внесения конъюгата (контроль 2); козы антитела к IgG человека для контроля внесения образца (контроль 3).

Для оценки чувствительности и специфичности разработанной тест-системы использовали ИФА и РПГА. Для анализа дискордантных результатов — линейный ИФА в формате иммуноблоттинга: тест-система «Syphilis TP» производства «Abbott laboratories» (Япония), вариант ИФА с применением хемилюминесцентной детекции; тест-система «TRNA TESRS» производства «BIO-RAD» (Франция), РПГА; тест-система «INNO-LIA Siphilis Score» производства «Innogenetics» (Бельгия), иммуноблоттинг. Выполнение тестов и учет результатов проводили в соответствии с инструкциями производителей.

Для оценки чувствительности экспериментальной тест-системы на основе иммуночипа было исследовано 200 образцов сывороток крови, содержащих антитела к *T.pallidum* (испытываемая группа), что подтверждено серологическими методами (ИФА). Сыворотки крови получены от пациентов, проходивших исследование на наличие специфических антител к *T.pallidum* в Центре молекулярной диагностики на базе ЦНИИ эпидемиологии.

Для анализа специфичности тест-системы была сформирована контрольная группа из 200 образцов. Сыворотки крови получены от пациентов, обследованных там же на различные заболевания с применением молекулярных и серологических методов диагностики.

Кроме того, использовали панель сывороток крови человека, содержащих и не содержащих антитела к *T.pallidum*, серии 004 (ЗАО «МБС», Новосибирск). Данная панель предназначена

для оценки чувствительности и специфичности иммуноферментных тест-систем для выявления антител к *T.pallidum*.

Образцы сывороток крови хранили в микропробирках при -70°C в виде аликвот по 100 мкл. Допускалось замораживание-оттаивание образцов не более двух раз.

В лунки на поверхности слайдов вносили по 50 мкл исследуемых сывороток в разведении 1:10 (раствор для разведения сывороток содержал 0,1% раствор казеина, pH 7,5). Слайды инкубировали с сыворотками 30 мин при 37°C на шейкере «PST-60 HL plus Thermo Shaker» производства «BioSan» (Латвия) при скорости вращения платформы 500 об/мин. После инкубации слайды 3 раза отмывали рабочим раствором фосфатно-солевого буфера с твином (ФСБ-Т) и вносили в лунки по 50 мкл рабочего разведения конъюгата (козьих антител к IgG человека, меченных TRITC в подобранном рабочем разведении). Далее слайды инкубировали 30 мин при 37°C на шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин. После инкубации слайды 3 раза отмывали рабочим раствором ФСБ-Т, высушивали в токе теплого воздуха и проводили сканирование.

Результаты анализа считывали с помощью флуоресцентного сканера ScanArray Express (Perkin Elmer). Программное обеспечение, прилагаемое к ScanArray Express, позволяет представить результаты в виде изображений флуоресцентного образа иммуночипа, которые после обработки могут быть представлены в виде таблиц цифровых значений флуоресценции, отнесенных к каждому пятну. Мы создали дополнительную программу, которая позволяет полученную количественную информацию по каждой зоне представлять в удобном формате и выдавать результаты анализа в автоматическом режиме. В случае нарушения оператором протокола проведения анализа (не добавлена сыворотка или конъюгат) программа выдает сообщение об ошибке.

Для каждого пятна регистрировали абсолютные значения флуоресценции при фиксированных показателях мощности лазеров и коэффициента усиления фотозлектронного умножителя сканера. Данные, получаемые с помощью иммуночипа, сопоставляли с результатами анализа сывороток с помощью зарегистрированных на территории Российской Федерации тест-систем.

В результате предложен алгоритм, в основе которого лежит расчет коэффициентов позитивности (КП) сыворотки для каждого антигена. КП рассчитывали как отношение сигнала флуоресценции исследуемого образца к критическому уровню сигнала флуоресценции (Cut off). Cut off рассчитывали для каждого антигена индивидуально и принимали равными 2хК , где К - значения флуоресценции отрицательного контрольного образца.

По аналогии с алгоритмом интерпретации результатов в тест-системе «INNO-LIA Siphilis Score» образец считали положительным, если значение КП больше или равно 1,0 для двух и более антигенов. Образец считали неопределенным (сомнительным) при значении КП боль-

ше или равным 1,0 только для одного антигена. Образец считали отрицательным, если значения КП меньше 1,0 для всех антигенов.

Алгоритм интерпретации результатов может быть уточнен по мере накопления опыта тестирования на иммуночипе сывороток крови пациентов на разных стадиях болезни сифилисом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Принцип работы экспериментальной тест-системы построен на непрямом методе выявления специфических антител к возбудителю с помощью флуоресцентной детекции. Для анализа на иммуночипе выбрана схема, максимально приближенная к традиционному ИФА. На первом этапе осуществляется инкубация с сывороткой крови рекомбинантных антигенов *T.pallidum*, раздельно иммобилизованных в виде микроочек на слайдах. При наличии в сыворотке крови антител к *T.pallidum* образуются комплексы антиген-антитело. После удаления несвязавшегося материала на поверхность слайда наносили раствор поликлональных антител козы к IgG человека, меченных родамином (конъюгат). После удаления несвязавшегося конъюгата слайды высушивали под током теплого воздуха и проводили выявление комплексов антиген-антитело с помощью флуоресцентного сканера.

Таблица 1. Показатели КП панели сывороток крови, содержащих и не содержащих антитела к *T.pallidum*, в экспериментальной тест-системе

Дан. по пасп.	Тр 47	Тр 17	Тр17	ТрпА	Сумм. рез.
Положительные сыворотки, П (№ 1 — 16)					
П	3,24	15,11	2,04	1,86	П
П	1,09	19,96	5,63	2,20	П
П	11,19	10,67	4,12	1,22	П
П	2,26	10,27	3,72	1,50	П
П	4,59	14,92	5,20	5,60	П
П	3,28	9,09	3,35	4,16	П
П	4,82	15,29	5,60	4,45	П
П	5,16	19,49	6,84	5,50	П
П	2,61	13,30	2,76	3,16	П
П	1,84	19,95	2,03	2,00	П
П	5,06	14,33	5,81	3,62	П
П	3,32	10,09	3,48	2,54	П
П	7,62	17,32	9,10	5,03	П
П	4,19	16,17	6,16	3,18	П
П	6,69	20,54	7,74	4,24	П
П	1,13	13,31	4,93	0,98	П
Отрицательные сыворотки, О (№ 17 — 24)					
О	0,45	0,36	0,66	0,54	О
О	0,56	0,68	0,56	0,38	О
О	0,36	0,52	0,64	0,78	О
О	0,76	0,49	0,55	0,57	О
О	0,67	0,78	0,59	0,63	О
О	0,47	0,58	0,66	0,63	О
О	0,45	0,39	0,55	0,50	О
О	0,54	0,67	0,76	0,61	О

Таблица 2. Оценка чувствительности и специфичности экспериментальной тест-системы

Сыворотки	Кол-во обр.	Кол-во пол.	Кол-во отр.	Кол-во неопр.
От б-ных сиф.	200	195	—	5
Из п. «МБС» (пол.)	18	18	—	—
Из п. «МБС» (отр.)	8	—	8	—
От б-ных Лайм-борр.	50	—	50	—
От б-ных лептоспир.	50	—	50	—
С выс. сод. РФ-факт.	20	—	20	—
От зд. дон.	80	—	80	—

Оптимизация условий иммобилизации белков и проведения иммунофлуоресцентного анализа на иммуночипе осуществлялась с применением панели сывороток ЗАО «МБС». Были подобраны буферные растворы для разведения образцов и конъюгата, время и температурный режим на всех стадиях инкубации с образцами и конъюгатом, разведение используемого клинического материала, хранение слайдов. Оптимальными считали такие условия, при которых наблюдались наибольшие различия в значениях сигналов флуоресценции (СФ) при анализе положительных и отрицательных сывороток.

В табл. 1 приведены результаты, полученные при тестировании панели сывороток ЗАО «МБС» в экспериментальной тест-системе на основе иммуночипа. Получены положительные результаты при тестировании образцов сывороток 1 — 16 (положительные сыворотки) данной панели и не выявлены специфические антитела к *T. pallidum* при анализе образцов 17 — 24 (отрицательные сыворотки). Чувствительность и специфичность экспериментальной тест-системы при постановке на панели сывороток крови, содержащих и не

содержащих антитела к сифилису, составили 100%.

Для оценки чувствительности и специфичности экспериментальной тест-системы на клиническом материале были сформированы две группы. Опытная группа сформирована из 200 положительных сывороток, содержащих специфические антитела к *T. pallidum*. Контрольная группа представлена образцами сывороток крови от доноров (n=80), пациентов, имеющих аутоиммунные заболевания (n=20), а также больных лептоспирозом (n=50) и Лайм-боррелиозом (n=50) для оценки перекрестных реакций.

Все сыворотки крови двух групп были протестированы на наличие специфических антител к *T. pallidum* с помощью зарегистрированных коммерческих диагностических тест-систем. Чувствительность разработанной тест-системы на основе иммуночипа составила 100% при постановке реакции на образцах опытной группы.

В ряду 200 положительных сывороток крови получены положительные результаты в 195 сыворотках крови (табл. 2). Неопределенными были результаты в 5 образцах, положительных только по одному антигену (Tr17). Последующее изучение данных образцов в коммерческом иммуноблоттинге (табл. 3) подтвердило результаты, полученные в экспериментальной тест-системе. Возможно, это связано с низким уровнем антител к возбудителю сифилиса (в частности, только к Tr17 белку). Специфичность экспериментальной тест-системы составила 100% при оценке сывороток крови контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы полученные рекомбинантные белки *T. pallidum* Tr47, Tr17, Tr15, TmpA обладают высокой технологичностью, позволяющей достичь высоких показателей чувствительности и специфич-

Таблица 3. Анализ неопределенных образцов

№	ИФА, S/CO*	РПГА, титр**	Иммуноблоттинг					Иммуночип, КП***				
			Tr47	Tr17	Tr15	TmpA	Результат	Tr47	Tr17	Tr15	TmpA	Результат
310	1,43	1:80	Отр	+1	Отр	Отр	н/п	0,78	3,61	0,56	0,66	н/п
91	3,64	1:80	Отр	+1,5	Отр	Отр	н/п	0,65	2,87	0,76	0,72	н/п
60	3,04	1:80	Отр	+2	Отр	Отр	н/п	0,49	3,99	0,80	0,83	н/п
Kc2	3,53	1:160	Отр	+2	Отр	Отр	н/п	0,52	6,15	0,71	0,32	н/п
Kc9	1,25	1:80	Отр	+1	Отр	Отр	н/п	0,49	3,98	0,75	0,95	н/п

Примечание. *Образец считается полож., если S/CO больше или равно 1, **образец считается полож. при титре больше или равным 1:80, ***результат для каждого антигена считается полож., если значение КП больше или равно 1.

ности при их использовании в коммерческих ИФА тест-системах и иммуноблоттинге [6, 8, 13].

Не вызывает сомнений, что использование тест-систем с отдельно нанесенными антигенами позволяет получить подробную информацию по спектру выявляемых антител и проследить динамику инфекционного процесса. Преимуществом иммуночипа является возможность его применения как в скрининговых, так и подтверждающих серологических исследованиях с использованием традиционного лабораторного оборудования для ИФА диагностики. Технология приготовления иммуночипов позволяет значительно снизить стоимость анализа по сравнению с ИФА тест-системами и иммуноблоттингом. Срок хранения иммуночипа в вакуумной упаковке при температуре (2 — 8)°С без потери чувствительности и специфичности составляет 6 месяцев.

Коммерчески доступные флуоресцентные сканеры, как правило, имеют функцию регистрации результатов в широком диапазоне длин волн в соответствии со способностью поглощения и эмиссии света отдельными видами флуорофоров. Это позволяет детектировать одновременно несколько типов серологических маркеров при использовании соответствующих конъюгатов, меченных флуорофорами с отличающимися спектральными характеристиками.

Так, при использовании тест-системы для серодиагностики сифилиса на основе иммуночипа появляется возможность на одной зоне одновременно выявлять специфические антитела как G, так и M класса, если использовать смесь антивидовых конъюгатов человека, модифицированных флуорофорами TRITC и FITC соответственно.

Таким образом, разработана экспериментальная тест-система для дифференциальной серологической диагностики сифилиса на основе иммуночипа, которая обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Начата апробация данной тест-системы на клиническом материале для детальной оценки возможности ее использования в скрининговых и подтверждающих исследованиях при диагностике сифилиса.

Работа выполнена при финансировании в рамках Государственного контракта между НИИ биомеди-

цинской химии им. В.А.Ореховича и ЦНИИ эпидемиологии № ГК 06-06/ПРО4 от 09.11.06.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и др. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. Вестн. дерматол. венерол. 2006, 2: 4 — 11.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
3. Романенко В.Н., Свистунов И.В., Лавриненко О.А. Проблемы и перспективы диагностики сифилиса плода и скрытых форм врожденного сифилиса грудного возраста. Дерматол. венерол. 2001, 3: 27 — 30.
4. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Нестеренко В.Г. и др. Результаты изучения диагностической эффективности новой тест-системы линейного иммуноферментного анализа «Inno-Lia™ Siphilis Score». Клинич. лаб. диагн. 2006, 3: 36 — 41.
5. Angenendt P. Progress in protein and antibody microarray technology. Drug Dis. Today. 2005, 10: 503 — 511.
6. Bachkhause J., Nesteroff S. Treponema pallidum western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2001, 39 (1): 9 — 14.
7. Gavin I., Kukhtin A., Glesne D. Analysis of protein interaction and function with a 3-dimensional MALDI-MS protein array. BioTechniques. 2005, 39: 99 — 107.
8. Hagedorn H., Rraminer-Hagedorn A., Bosschere R. Evaluation of INNO-LIA syphilis Assay as a confirmatory test for syphilis. J. Clin. Microbiol. 2002, Mar.: 973 — 978.
9. Mattoon D., Michaud G., Merkel J., Schweitzer B. Biomarker discovery using protein microarray technology platforms: antibody-antigen complex profiling. Exp. Rev. Proteom. 2005, 2: 879 — 889.
10. Meyer M.P., Eddy T., Baughn R.E. Analysis of western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 1994, 32 (3): 629 — 633.
11. Nielsen U.B., Geierstanger B.H. Multiplexed sandwich assays in microarray format. J. Immunol. Meth. 2004, 290: 107 — 120.
12. Schmitz J., Gettis K., Mauney C. et al. Laboratory diagnosis of congenital syphilis by immunoglobulin M (IgM) and IgA immunoglobuloblotting. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994, 1 (1): 32 — 37.
13. Schmidt B., Edjlalipour M., Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies against Treponema pallidum in patients with primary syphilis. J. Clin. Microbiol. 2000, Mar.: 1279 — 1282.
14. Srivastava M., Eidelman O., Jozwik C. et al. Serum proteomic signature for cystic fibrosis using an antibody microarray platform. Mol. Gen. Metab. 2006, 87 (4): 303 — 310.

Поступила 10.02.08