ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.36-002-022:578.891]-078.33

Т. А. Чеканова, М. Л. Маркелов, И. Н. Манзенюк, А. С. Сперанская, А. В. Шишова, Ю. А. Алексеева, А. Е. Судьина, С. И. Браславская, Г. А. Шипулин

РАЗРАБОТКА ИММУНОЧИПА ДЛЯ РАЗДЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В группе вирусных гепатитов особое место занимает вирусный гепатит С (ВГС), напряженный эпидемиологический потенциал которого поддерживается как высокой частотой хронизации данного заболевания, так и ростом его бессимптомного вирусоносительства [4]. Внедрение в практику здравоохранения иммуноферментных диагностикумов последних поколений для первичного скрининга компонентов крови, разработанных на основе рекомбинантных белков и(или) синтетических пептидов, кодируемых core-, NS3-, NS4-, NS5-регионами генома ВГС, позволило снизить риск посттрансфузионного заражения данной инфекцией. Вместе с тем важное диагностическое значение имеет исследование динамики выработки антител к вирусу гепатита С, что дает возможность не только изучить эпитопную поливалентность ВГС-антигенов, но и оценить иммунный ответ на разных стадиях заболевания [1, 2, 4, 9]. Однако выявление суммарных антител к ВГС в одной лунке иммунопланшета не позволяет разграничить острую и хроническую фазы болезни, прогнозировать ее течение и успех применяемой противовирусной терапии.

Несмотря на неоднозначность мнений в отношении важности выявления ряда антител к ВГС для принципиального улучшения качества тест-систем и серологической диагностики гепатита С (в частности, антител к NS5) [6, 8], большинство специалистов считают необходимым использование наиболее широкого спектра антигенов на иммуносорбенте с целью повышения информативности лабораторного исследования, особенно на этапе подтверждения положительных результатов первичного скрининга крови [4, 10]. Вместе с тем следует отметить высокую стоимость препаратов, предназначенных для проведения подтверждающего анализа методом линейного иммунного блоттинга, преимущественно зарубежного производства. В то же время использование ИФА-тест-систем с раздельной иммобилизацией антигенов требует значительного расхода биологического материала (сыворотки или плазмы крови человека). Таким образом, создание нового класса диагностических препаратов, способных раздельно детектировать целый спектр интересующих маркеров, с использованием минимального объема биологического материала и совмещающих достоинства ИФА-анализа и иммуноблоттинга в одном формате является актуальным. Новейшие разработки в области биотехнологии свидетельствуют о том, что всем этим требованиям удовлетворяют тест-системы в формате биочипов [7].

Цель работы – разработка и клиническая апробация иммуночипа для серологической диагностики ВГС.

Материалы и методы. Получение рекомбинантных антигенов ВГС. Выбор нуклеотидных последовательностей для клонирования осуществляли с учетом эпидемиологических особенностей распространения генотипов и субтипов возбудителя ВГС на территории Российской Федерации. Из плазмы крови ВГС-инфицированных пациентов получали кДНК (кодирующую ДНК), используя наборы "РИБО-сорб" и "Реверта-L" производства ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). В соответствии с первичными структурами генов ВГС различные варианты олигонуклеотидных праймеров были синтезированы в ЗАО "Синтол" (Москва). Амплификацию фрагментов генов ВГС (core-1b, NS3-1b, c100p (фрагмент NS4), m-51-1b (фрагмент NS4), NS5-1b, core-3a, NS3-3a, m-51-3a (фрагмент NS4) и NS5-3a) осуществляли в термоциклере "Терцик" (ЗАО "НПФ ДНК-технология", Москва). Клонирование амплифицированных фрагментов осуществляли в виде пар повторяющихся последовательностей в векторе pHCV-T7 (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно методике, описанной ранее [3], с последующей его трансформацией в штамм E. coli BL-21 (DE3).

Нуклеотидную последовательность клонированных участков определяли по методу Сенгера с помощью секвенатора Applied Biosystems (США). Сопоставление нуклеотидных последовательностей с базой данных LosAlamos проводили, используя программу Vector NTI Advanced v9.0.

Очистку рекомбинантных антигенов осуществляли с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Наличие белка во фракциях выявляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [5]. Всего было получено 20 вариантов высокоочищенных рекомбинантных структурных и неструктурных белков (NS3, NS4, NS5, core).

Анализ иммунореактивности полученных антигенов проводили в сравнении с коммерческими рекомбинантными белками и пептидами (15 вариантов структурных и неструктурных антигенов), при-

меняемыми при конструировании иммуносорбентов тест-систем в формате ИФА и линейного иммунного блоттинга.

Приготовление иммуносорбента. Рекомбинантные антигены ВГС иммобилизовали на поверхность микроскопных слайдов с альдегидным покрытием (CSS-100 Silylated Slides или VALS 25 Vantage производства CEL Associates Inc., США) с помощью робота для контактной печати XactII ("LabNext", США), используя специальную капиллярную иглу с внутренним диаметром 0,35 мм. Рабочие концентрации антигенов готовили в однократном фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4, содержащем в конечном разведении 0,01% твина-20, 2,5% глицерола, 10% диметилсульфоксида ("Sigma", США). Для исключения ошибок при постановке анализа и контроля качества работы иммуночипа в состав иммуносорбента были включены внутренние контроли: сорбционный буферный раствор, нормальный иммуноглобулин человека и антитела козы к IgG человека (ООО "ИМТЕК", Москва) в конечном разведении 200 мкг/мл. Каждому иммобилизованному антигену и внутреннему контролю соответствовал индивидуальный спот (пятно) в двух повторах. Сорбцию антигенов и контролей на поверхности слайдов проводили при комнатной температуре в течение ночи в специальной камере с поддержанием 60% влажности воздуха.

С целью инактивации неспецифической сорбции антигенов и улучшения морфологии спотов слайды с иммобилизованными ранее белками погружали в блокирующий раствор (0,1 М ФСБ pH 7,4, с казеинатом натрия, "Sigma", США) в конечной концентрации 0,5% на 1 ч при комнатной температуре с последующим высушиванием в конвекционном потоке теплого воздуха. Приготовленные иммуносорбенты чипов помещали в пластиковые контейнеры по 5 штук, герметично запаивали под вакуумом в фольгированные пакеты с вложенным силикагелем и хранили в холодильнике при 2—8°С.

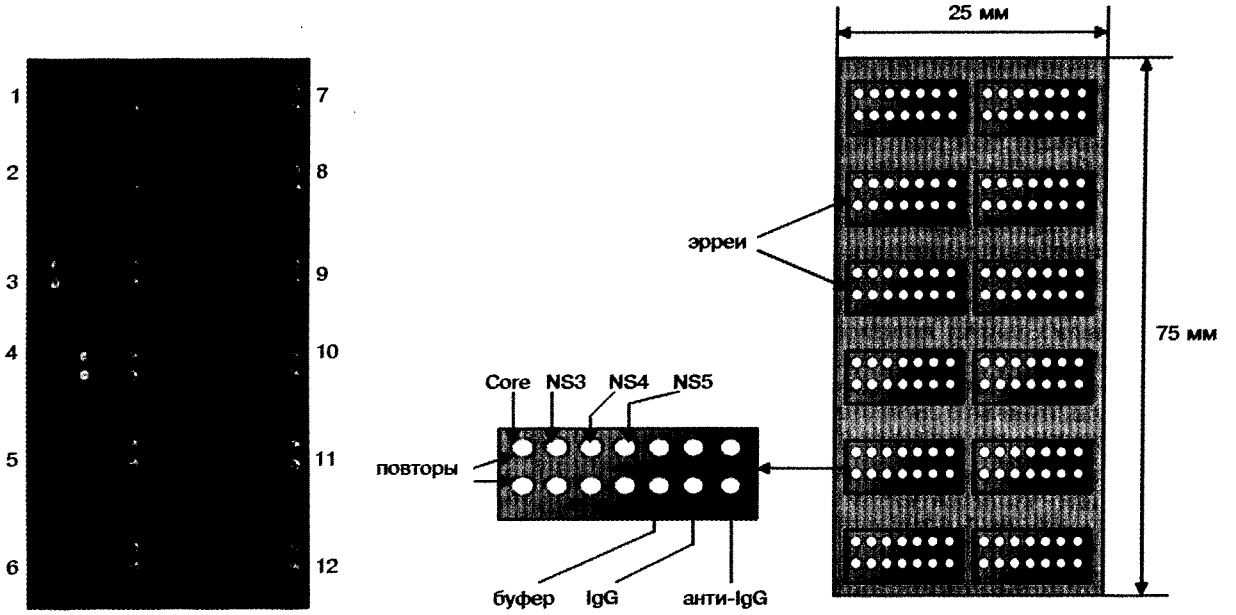
Принцип работы иммуночипа и подбор условий проведения серологического анализа. Принцип работы иммуночипа построен на непрямом методе выявления специфических антител к возбудителю ВГС с помощью флюоресцентной детекции. Подбор оптимальных условий постановки реакции осуществляли путем варьирования следующих параметров: времени инкубации на иммуносорбенте исследуемых образцов и рабочих разведений конъюгатов, температурного режима инкубации, конечного разведения образцов. Сравнительное изучение чувствительности и специфичности разрабатываемого иммуночипа проводили в двух вариантах: на основе двухшагового анализа с использованием антивидовых конъюгатов козьих антител к IgG и IgM человека, модифицированных TRITC или FITC соответственно, и трехшагового анализа со следующей системой детекции: суммарный конъюгат анти-IgG + анти-IgM человека с биотином — стрептавидин, модифицированный TRITC (FITC). В работе были использованы концентраты конъюгатов производства ООО "ИМТЕК" (Москва). Все этапы инкубации проводили при температуре 37°С, однократную промывку слайдов раствором 0,1 М ФСБ (pH 7,4) с содержанием твина-20 в конечной концентрации 0,1% осуществляли после каждой стадии. Перед сканированием слайды однократно промывали дистиллированной водой и высушивали.

Учет и интерпретация результатов анализа на иммуночипе. Обработку результатов серологического анализа на иммуночипе проводили с помощью сканера ScanArray Express ("Perkin Elmer", США) и прилагаемого к нему программного обеспечения, оценивая интенсивность сигнала флюоресценции соответствующих спотов (в местах локализации антигенов и внутренних контролей) и суммарного фона эррея. Для каждого спота рассчитывали коэффициенты (К), представляющие собой отношение абсолютного значения флюоресценции конкретного спота (за вычетом суммарного фона вокруг эррея) к фону. Значение критического уровня (cut off) для каждого из антигенов и контролей устанавливали путем умножения среднего значения К в эррее с внесенным контрольным отрицательным образцом тест-системы (К-) на 2. Положительным результатом на наличие антител к определенному антигену ВГС в исследуемом образце считали те показатели, при которых средние значения К определялись выше соответствующего критического уровня (cut off).

Образец считали положительным, если средние значения коэффициентов К, соответствующие 2 и более антигенам ВГС, превышали или были равны критическому уровню (cut off). Исследуемый образец считали неопределенным (сомнительным) при выявлении положительного сигнала К только для одного из антигенов. Образец считали отрицательным, если значения К для всех иммобилизованных антигенов были меньше значения критического уровня.

Материал для клинической апробации тест-системы в формате иммуночипа. Первичную оценку чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы в формате иммуночипа проводили на стандартной панели сывороток крови, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С "Стандарт АТ(+/-)ВГС" — ОСО 42-28-310-02П, серия 12 производства ЗАО "Медико-биологический Союз" (Новосибирск), аттестованную в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора (Москва).

Чувствительность иммуночипа на клиническом материале была изучена на 200 образцах сывороток крови больных гепатитом С с подтвержденным наличием суммарных антител классов G и M в коммерческих ИФА-тест-системах. Дополнительно препарат оценивали на 15 образцах сывороток крови больных гепатитом С, наличие специфических антител в которых или не было подтверждено в конфирматорных (подтверждающих) тестах, или данные сыворотки в данных тестах были положительны только к одному из белков NS3, NS4, NS5 на core. В опытную группу дополнительно были включены 4 образца плазмы крови человека, содержащие РНК вируса и отрицательные на наличие анти-ВГС, а также 5 образцов плазмы крови от ВГС-инфицированного пациента, которые были получены в разные периоды специфической про-



Дизайн иммуносорбента тест-системы в формате иммуночипа для серологической диагностики ВГС и флюоресцентное изображение результатов иммунореакции для 5 ВГС-положительных образцов с различным спектром антител (№ 1, 3—5, 12) и 7 негативных образцов сывороток крови (№ 2, 6—11). Характеристика ВГС-положительных образцов: № 1 содержит анти-core, анти-NS3, анти-NS4; № 3 содержит анти-core, анти-NS3, анти-NS5; № 4 имеет полный спектр антител к ВГС-положительному контрольному образцу тест-системы (К+), № 5 — анти-core; № 12 — содержит антитела к core и NS3. Отрицательный контрольный образец тест-системы (К-) — № 11).

тивовирусной терапии (образцы исследованы в динамике на наличие РНК вируса и антител в коммерческих тест-системах соответствующего назначения).

Контрольная группа включала 200 образцов сывороток или плазмы крови человека, в том числе от здоровых доноров (n = 100), от лиц с аутоиммунными заболеваниями (n = 20), больных гепатитами А и В (n = 50) и от пациентов, в биохимических анализах которых выявлено повышенное содержание билирубина и аланинаминотрансферазы (n = 30).

Клинический материал получен из клинико-диагностического отделения Центра молекулярной диагностики ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Перечень используемых в работе коммерческих тест-систем. Для первичного скрининга на наличие анти-ВГС в образцах сывороток (плазмы) человека использовали ИФА-тест-системы для обнаружения суммарных антител классов G и M к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека: "ИФА-АНТИ-HCV" (ООО НПО "Диагностические системы", Н. Новгород) и набор "Murex-HCV-EIA" (версия 4; "Abbot/Murex", Франция).

Для подтверждения положительных результатов первичного скрининга и изучения спектра антител к ВГС использовали следующие диагностические препараты:

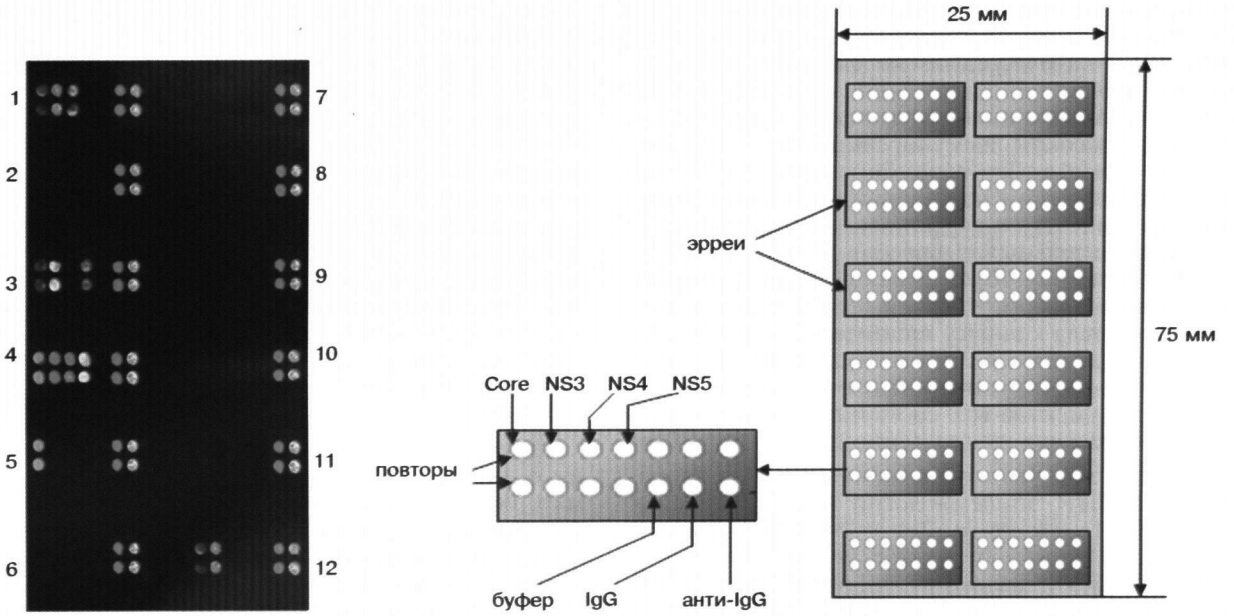
"ЛИА ВГС" (ООО "НИАРМЕДИК ПЛЮС", Москва) — набор реагентов для подтверждения наличия антител класса G к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови человека (линейный иммуноблот) с иммобилизованными дискретно на мембране антигенами из области core (2 полипептида — С1 и С2), Е2-гипервариабельной области, NS3-спирального региона, NS4A, NS4B, NS5A,

иммуноферментные тест-системы для раздельного выявления и подтверждения присутствия антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С (core, NS3, NS4, NS5): "ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM", комплект 1 (ООО НПО "Диагностические системы", Н. Новгород) и "РекомбиБест анти-ВГС-стрип-G/M" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск).

Выявление РНК ВГС из плазмы крови человека проводили с использованием коммерческой ПЦР-тест-системы с учетом результатов в режиме реального времени "АмплиСенс-HCV-FRT" (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Результаты и обсуждение. Необходимым условием для разработки любой диагностической тест-системы является подбор антигенов для иммобилизации их на твердой фазе. Данные антигены должны быть высокоочищенными и содержать иммунодоминантные эпитопы, позволяющие максимально сократить количество ложноположительных реакций и повысить чувствительность теста особенно при анализе ВГС-положительных образцов, полученных на ранней стадии инфицирования.

С целью отбора наиболее иммуногенных ВГС-белков при конструировании иммуночипа нами была изучена их иммунореактивность с образцами сывороток крови, содержащими различный спектр антител к ВГС в низких концентрациях. Оценку специфичности проводили на панели образцов сывороток (плазмы) крови человека, не содержащих антитела к данному возбудителю. Для каждого иммобилизованного в рабочем разведении антигена



Дизайн иммуносорбента тест-системы в формате иммуночипа для серологической диагностики ВГС и флюоресцентное изображение результатов иммунореакции для 5 ВГС-положительных образцов с различным спектром антител (№ 1, 3—5, 12) и 7 негативных образцов сывороток крови (№ 2, 6—11). Характеристика ВГС-положительных образцов: № 1 содержит анти-core, анти-NS3, анти-NS4; № 3 содержит анти-core, анти-NS3, анти-NS5; № 4 имеет полный спектр антител к ВГС-положительному контрольному образцу тест-системы (К+), № 5 — анти-core; № 12 — содержит антитела к core и NS3. Отрицательный контрольный образец тест-системы (К-) — № 11).

тивовирусной терапии (образцы исследованы в динамике на наличие РНК вируса и антител в коммерческих тест-системах соответствующего назначения).

Контрольная группа включала 200 образцов сывороток или плазмы крови человека, в том числе от здоровых доноров (n = 100), от лиц с аутоиммунными заболеваниями (n = 20), больных гепатитами А и В (n = 50) и от пациентов, в биохимических анализах которых выявлено повышенное содержание билирубина и аланинаминотрансферазы (n = 30).

Клинический материал получен из клинико-диагностического отделения Центра молекулярной диагностики ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Перечень используемых в работе коммерческих тест-систем. Для первичного скрининга на наличие анти-ВГС в образцах сывороток (плазмы) человека использовали ИФА-тест-системы для обнаружения суммарных антител классов G и M к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека: "ИФА-АНТИ-HCV" (ООО НПО "Диагностические системы", Н. Новгород) и набор "Murex-HCV-EIA" (версия 4; "Abbot/Murex", Франция).

Для подтверждения положительных результатов первичного скрининга и изучения спектра антител к ВГС использовали следующие диагностические препараты:

"ЛИА ВГС" (ООО "НИАРМЕДИК ПЛЮС", Москва) — набор реагентов для подтверждения наличия антител класса G к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови человека (линейный иммуноблот) с иммобилизованными дискретно на мембране антигенами из области core (2 полипептида — С1 и С2), Е2-гипервариабельной области, NS3-спирального региона, NS4A, NS4B, NS5A,

иммуноферментные тест-системы для раздельного выявления и подтверждения присутствия антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С (core, NS3, NS4, NS5): "ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM", комплект 1 (ООО НПО "Диагностические системы", Н. Новгород) и "РекомбиБест анти-ВГС-стрип-G/M" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск).

Выявление РНК ВГС из плазмы крови человека проводили с использованием коммерческой ПЦР-тест-системы с учетом результатов в режиме реального времени "АмплиСенс-HCV-FRT" (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Результаты и обсуждение. Необходимым условием для разработки любой диагностической тест-системы является подбор антигенов для иммобилизации их на твердой фазе. Данные антигены должны быть высокоочищенными и содержать иммунодоминантные эпитопы, позволяющие максимально сократить количество ложноположительных реакций и повысить чувствительность теста особенно при анализе ВГС-положительных образцов, полученных на ранней стадии инфицирования.

С целью отбора наиболее иммуногенных ВГС-белков при конструировании иммуночипа нами была изучена их иммунореактивность с образцами сывороток крови, содержащими различный спектр антител к ВГС в низких концентрациях. Оценку специфичности проводили на панели образцов сывороток (плазмы) крови человека, не содержащих антитела к данному возбудителю. Для каждого иммобилизованного в рабочем разведении антигена

определяли отношения средних коэффициентов (К) анти-ВГС-положительных низкотитражных образцов (n = 10) к средним коэффициентам К сывороток крови, не содержащих антитела к ВГС (n = 10). Максимальные отношения свидетельствовали о высокой иммунореактивности белков. Окончательный отбор рекомбинантных антигенов для иммобилизации на слайдах был осуществлен благодаря анализу коэффициентов позитивности (КП) положительных сывороток панели ОСО 42-28-310-02П (№ 1—16) с оценкой специфичности (постановка сывороток крови человека, не содержащих антитела к вирусу гепатита С — № 17—24 в составе той же панели). КП вычисляли для каждого иммобилизованного антигена как отношение средних коэффициентов К к соответствующему значению критического уровня (cut off).

Установлено, что комбинации антигенов производства ЦНИИ эпидемиологии (всего 4 группы: 1-я — core-1b + core-3a, 2-я — NS3-1b + NS3-3a, 3-я — c100p + m-51-1b + m-51-3a, 4-я — NS5-1b + NS5-3a), иммобилизованные индивидуально, обеспечивали наиболее высокие показатели чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы. Очевидно, что каждая композиция белков ВГС, адсорбированная на поверхности активированных слайдов, может рассматриваться как единый целостный антиген, обладающий уникальными иммуногенными характеристиками. Дизайн иммуносорбента чипа представлен на рисунке.

Следует отметить, что некоторое повышение КП анти-ВГС-положительных образцов сывороток крови человека без снижения специфичности наблюдали при трехшаговой постановке серологического анализа на чипе. Такая постановка включала 60-минутную инкубацию на иммуносорбенте исследуемых образцов в конечном разведении 1:2 и последовательные 30-минутные экспозиции со смесью антивидовых конъюгатов анти-IgG и анти-IgM человека, меченных биотином и рекомбинантным стрептавидином, модифицированным TRITC(FITC). С целью оптимизации условий постановки реакции в дальнейшей работе была использована двухшаговая система проведения анализа на иммуночипе (60-минутная инкубация с исследуемыми образцами и последующей 30-минутной экспозицией с рабочим разведением антивидового конъюгата). При такой постановке анализа иммуночип продемонстрировал 100% чувствительность и специфичность на стандартной панели сывороток ОСО 42-28-310-02П. КП положительных образцов данной панели (№ 1—16) приведены в табл. 1 в сравнении с результатами тестирования в "ЛИА-ВГС".

Диагностическая эффективность разработанного препарата была изучена на клиническом материале. Чувствительность иммуночипа на 200 образцах сывороток крови человека, содержащих антитела к ВГС (по данным тестирования в скрининговых ИФА-тест-системах), составила 100%. В то же время спектр выявляемых антител был различным. Наиболее часто наблюдали положительную суммарную реактивность с антигенами core, NS3, NS4, NS5 (67%). Специфические антитела к любым двум антигенам ВГС определяли в 27% образцов данной группы. Антитела к одному из белков ВГС, иммобилизованных на слайде чипа, были выявлены для 12 (6%) образцов, в данном случае результат серологического исследования интерпретирован как неопределенный или сомнительный.

Учитывая, что коммерческие тест-системы содержат в составе иммуносорбента антигены (полипептиды) и/или синтетические пептиды ВГС, которые различаются по своей иммунореактивности от вирусоспецифических антител, была изучена

Таблица 1

Результаты исследования положительных сывороток стандартной панели, содержащих и не содержащих антитела к ВГС ОСО 42-28-310-02П (серия 12), в иммуночипе и линейном блоте "ЛИА-ВГС"

№ п/п	Субтип по паспорту	Результат в "ЛИА-ВГС"						КП в иммуночипе			
		C1	C2	E2	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5
1	1b	2+	+	-	2+	-	-	**4,36**	**4,17**	**1,75**	0,56
2	1b	1+	±	-	2+	-	-	**2,22**	**3,03**	0,41	0,39
3	-	2+	+	-	2+	+	-	**3,70**	**7,31**	**3,21**	**1,71**
4	-	+	±	-	+	±	-	**2,36**	**2,73**	**1,65**	0,29
5	1b	+	+	-	3+	2+	+	**3,35**	**3,69**	**12,84**	**9,35**
6	1b	±	-	-	3+	+	±	**2,35**	**4,88**	**4,40**	**4,61**
7	1b	+	±	±	3+	+	-	**1,94**	**3,58**	**8,38**	0,76
8	1b	-	-	-	2+	+	-	**0,45**	**4,41**	**7,89**	0,55
9	3a	2+	±	-	+	3+	+	**3,25**	**3,36**	**5,03**	**5,40**
10	3a	+	-	-	±	2+	±	**1,78**	**3,75**	**10,20**	**4,74**
11	1b	+	±	-	2+	+	-	**1,49**	**4,23**	0,26	**2,77**
12	1b (2a или 2c)	2+	+	-	±	-	-	**3,17**	**3,07**	0,34	0,33
13	1b (2a или 2c)	2+	+	-	-	-	-	**6,75**	**6,53**	0,64	0,28
14	1b	2+	±	-	2+	-	-	**2,29**	**2,90**	0,23	0,49
15	1b	+	-	-	1,5+	-	-	**1,85**	**5,33**	0,38	**2,19**
16	1b	+	-	-	1,5+	-	-	**1,82**	**2,66**	0,35	**1,20**

Примечание. КП — коэффициент позитивности в иммуночипе — отношение среднего значения коэффициента К для конкретного антигена к соответствующему значению cut off, темным цветом отмечены КП ≥ 1 (положительный ответ в иммуночипе к определенному антигену).

корреляция результатов анализа с анти-ВГС-положительными сыворотками (n = 100) в подтверждающих тестах и иммуночипе. Совпадение по спектру выявляемых антител в биочипе и подтверждающих ИФА-тест-системах было достаточно высоким: 72% по сравнению с "ДС-ИФА-анти-HCV-СПЕКТР-GM" и 67% с "РекомбиБест анти-ВГС спектр G/M". Преимущество по выявляемому спектру антител в иммуночипе по сравнению с результатами тестирования с "ДС-ИФА-анти-HCV-СПЕКТР-GM" и "РекомбиБест анти-ВГС спектр G/M" было выше в 28 и 21% образцах соответственно.

Следует отметить, что правила интерпретации результатов иммуноанализа тест-системами различных производителей, выявляющими спектр антител, отличаются. По этой причине при изучении анти-ВГС-позитивных сывороток крови (по данным первичного скрининга) в иммуночипе и верификационных ИФА-тестах количество подтвержденных и сомнительных образцов варьировало (табл. 2).

Особый интерес представляли 4 образца плазмы крови человека, содержащие РНК ВГС и отрицательные на наличие специфических иммуноглобулинов классов G и M к данному вирусу (по результатам тестирования в коммерческих скрининговых ИФА-тест-системах). При постановке анализа в формате иммуночипа во всех образцах были выявлены специфические антитела к ВГС: core в 1 образце, NS3 в 2 образцах и NS4 в 1 образце. Дальнейшее изучение данных образцов в блоте "ЛИА-ВГС" показало, что в 2 из 4 были отмечены слабые специфические полосы на уровне 0,5 ± cut off для NS3 (образец 1) и NS4 (образец 1), результаты исследования в соответствии с инструкцией по применению к тест-системе интерпретируются как отрицательные. В то же время при постановке данных образцов в иммуночипе в соответствии с нашей интерпретацией результатов анализа детектировали сомнительный результат, определенно требующий повторного сбора материала и дальнейшего наблюдения иммунного ответа к ВГС в динамике.

Таблица 2

Результаты тестирования анти-ВГС-положительных образцов в иммуночипе и коммерческих подтверждающих ИФА-тест-системах (n = 100)

Тест-система	Количество подтвержденных положительных образцов	Количество неопределенных результатов
Иммуночип	КП > cut off для 2 антигенов и более 92/100	КП > cut off для 1 антигена 8/100
"ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM"	КП > cut off для 2 антигенов и более 90/100	КП > cut off для 1 антигена 10/100
"РекомбиБест анти-ВГС-стрип-G/M"	КП > cut off для core или для любых 2 антигенов 98/100	КП > cut off для 1 из неструктурных белков 2/100

Примечание. В скобках указана интерпретация результатов данных серологического анализа для каждой тест-системы. КП для ИФА-тест-систем вычисляется как отношение ОП (оптической плотности) образца к ОП, критической для тест-системы. Для иммуночипа КП вычисляется как отношение коэффициента К для каждого иммобилизованного антигена к соответствующему критическому уровню (cut off).

Изучение образцов плазмы крови ВГС-инфицированного пациента, получавшего специфическую терапию, показало, что в пробе, взятой на момент установления отрицательных результатов РНК ВГС и специфических антител (в скрининговых ИФА-тест-системах), при постановке в иммуночипе детектировали положительный спектр антител NS4 + core, тогда как в ИФА-подтверждающих тестах выявляли антитела только к core-антигену. Следует отметить, что при анализе пробы, взятой месяцем ранее, в иммуночипе регистрировали специфические антитела к core-антигену ВГС, в то время как в ИФА-подтверждающих тест-системах серологический результат был отрицательным. Данный случай свидетельствует прежде всего о более высоких показателях чувствительности тест-систем с раздельной детекцией спектра антител по сравнению со скрининговыми тестами. Эффективная иммобилизация антигенов на слайде и правильный подбор комбинации наиболее иммунореактивных рекомбинантных белков для сорбции позволяют достичь высоких аналитических параметров иммуночипа.

Анализ 15 сомнительных образцов сывороток крови человека в иммуночипе полностью коррелировал с результатами анализа, полученными в ИФА-подтверждающих тестах и иммунном блоттинге. Во всех тест-системах было выявлено 5 положительных и 2 отрицательных образца.

Специфичность иммуночипа на контрольной группе сывороток крови человека составила 99,5%. В 1 случае были получены позитивные значения коэффициента К к core-антигену. Дальнейший анализ данного образца показал, что уровень аланинаминотрансферазы в нем превосходил норму в 2,5 раза, что может свидетельствовать о раннем этапе инфицирования. В целом специфичность тест-системы для серодиагностики ВГС в формате иммуночипа не уступала ИФА-препаратам подобного назначения и линейному иммунному блоттингу.

Разработанная тест-система в формате иммуночипа для серологической диагностики гепатита С имеет высокие показатели чувствительности и специфичности. Преимуществом нового теста является возможность его применения как в скрининговых, так и подтверждающих серологических исследованиях.

Следует отметить, что формат иммуночипа позволяет единовременно детектировать несколько типов серологических маркеров, в частности специфические антитела как G-, так и M-классов к ВГС, при использовании смеси соответствующих антивидовых конъюгатов, меченных флюорофорами с отличающимися спектральными характеристиками. Кроме того, при постановке анализа к спектру интересующих маркеров на биочипах требуется существенно меньшее количество биологического материала (не более 30 мкл) по сравнению с ИФА-подтверждающими диагностикумами (к примеру, для определения антител одного класса к core, NS3, NS4, NS5 необходимо от 80 до 200 мкл

образца в зависимости от используемой тест-системы). Таким образом, технология с применением биочипа позволяет значительно снизить стоимость серологического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Круглов И. В., Огиенко О. Л., Знойно О. О.* и др. // Вопр. вирусол. — 2003. — № 2. — С. 36—40.
2. *Круглов И. В.* Особенности гуморального иммунного ответа при гепатитах А, С, Дельта и их значение для клиники и диагностики: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2006.
3. *Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж.* Методы молекулярного клонирования. — М., 1984.
4. *Михайлов М. И.* // Вирусные гепатиты. — 2001. — № 2.
5. *Скоупс Р.* Методы очистки белков. — М., 1985.
6. *Barrera J. M., Francis B., Ercilla G.* et al. // Vox. Sang. — 1995. — Vol. 69. — P. 15—18.
7. *Butte A.* // Nat. Rev. Microarray collect. — 2004. — P. 11—20.
8. *Huber K. R., Sebesta C., Bauer K.* // Hepatology. — 1996. — Vol. 24. — P. 471—473.
9. *Liu D. X.* // Med. Hypothes. — 2001. — Vol. 56. — P. 405—408.
10. *Pawlotsky J. M.* // J. Hepatol. — 1999. — Vol. 31. — Suppl. 1. — P. 71—79.

Поступила 14.02.08

DESIGN OF AN IMMUNOCHIP FOR SEPARATE DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS ANTIBODIES. *T. A. Chekanova, M. L. Markelov, I. N. Manzenyuk, A. S. Speranskaya, A. V. Shishova, Yu. A. Alekseyeva, A. Ye. Sudyina, S. I. Braslavskaya, G. A. Shipulin*

A test kit as an immunochip designed for the diagnosis of hepatic C virus (HCV) has a high sensitivity and specificity. Recombinant HCV antigens were separately immobilized on the activated slides together with internal controls. Serum test results were red by ScanArray Express. K-factor and corresponding value of cut-off were calculated for each antigen and internal controls. Comparative evaluation of the sensitivity and specificity of the immunochip was carried out by commercial ELISA test kits and linear blotting analyses on 448 blood samples containing and free from NCV antibodies.

Информация для авторов

ТРЕБОВАНИЯ К РИСУНКАМ, представленным на магнитных носителях

Черно-белые штриховые рисунки:

- формат файла — **TIFF** (расширение *.tif), любая программа, поддерживающая этот формат (Adobe PhotoShop, CorelDRAW, Adobe Illustrator и т. п.);
- режим — **bitmap** (битовая карта);
- разрешение — **600 dpi** (пиксели на дюйм);
- серые и черные заливки должны быть заменены на косую, перекрестную или иную штриховку;
- рисунок должен быть **обрезан** по краям изображения и **очищен** от "пыли" и "царапин";
- ширина рисунка — **не более 180 мм**, желательно не использовать ширину от 87 до 150 мм;
- высота рисунка — не более 230 мм (с учетом запаса на подрисуночную подпись);
- размер шрифта подписей на рисунке — **не менее 7 pt** (7 пунктов);
- возможно использование сжатия LZW или другого;
- носители — floppy 3.5" (1,44 MB), Zip 100 MB, CD-ROM, CD-R, CD-RW;
- обязательно наличие распечатки.

Цветные изображения, фотографии и рисунки с серыми элементами:

- платформа (компьютер) — IBM PC или совместимый;
- формат файла рисунка — TIFF (расширение *.tif);
- программа, в которой выполнена публикация, — PageMaker 6.5; CorelDRAW 7 и 8;
- цветовая модель — CMYK;
- разрешение — не более 300 dpi (пиксели на дюйм) или 119,975 пикселя на 1 см;
- рисунок должен быть связан с публикацией;
- возможно использование сжатия LZW;
- не использовать цвета PANTONE;
- носители — Zip 100 MB; компакт-диск CD-ROM.