

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.36-002-022-078.33

А. А. Потапова¹, Т. А. Чеканова², М. Л. Маркелов², Е. А. Пудова², Н. П. Кирдяшкина², Г. А. Шипулин²,
В. М. Дронова¹, Н. Н. Потекаев¹

ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЧИПОВ ПРИ НИЗКОМ СОДЕРЖАНИИ АНТИТЕЛ К CORE-АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

¹Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения Москвы;

²ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Выявление антител к Core-антигену вируса гепатита С в тест-системах для твердофазного иммуноферментного анализа с низкой оптической плотностью может являться не только результатом истинного наличия антител, но также следствием неспецифической реакции сыворотки крови. В представленной работе были изучены диагностические возможности иммуночипов в целях верификации наличия маркеров вирусного гепатита С при слабой позитивной реакции сыворотки крови на Core-антиген в иммуноферментном анализе и иммуноблотах. Обнаружено, что иммуночипы и иммуноблоты обладают сходной специфичностью в отношении выявления антител к Core-антигену, при этом более чем в 90% образцов в иммуночипах дополнительно выявлялись антитела к неструктурным антигенам вируса гепатита С.

Ключевые слова: Core-антиген вируса гепатита С, иммуночипы, антитела

A.A. Potapova, T.A. Tchekanova, M.L. Markelov, Ye.A. Pudova, N.P. Kirdyashkina, G.A. Shipulin, V.M. Dronova, N.N. Potekayev

THE VERIFICATION POSSIBILITIES OF IMMUNOCHIPS UNDER LOW CONTENT OF ANTIBODIES TO CORE-ANTIGEN OF VIRUS OF HEPATITIS C

The detection of antibodies to Core-antigen of virus of hepatitis C in test-systems for solid-phase immune-enzyme analysis with low optical density can be a result not only of true availability of antibodies but an effect of nonspecific reaction of blood serum. The diagnostic possibilities of immunochips to be used in immune-enzyme analysis for verification of availability of markers of viral hepatitis C were investigated in conditions of low positive reaction of blood serum to core-antigen. It is established that immunochips and immunoblots have similar specificity concerning detection of antibodies to Core-antigen. At that, in immunochips antibodies to nonstructural antigens of virus of hepatitis C were additionally detected in more than 90% of samples.

Key words: core-antigen, hepatitis C, immunochips, antibody

Совершенствование лабораторной диагностики вирусного гепатита С неразрывно связано с разработкой новых молекулярно-биологических методов исследования. В настоящее время выявление лиц, инфицированных вирусом гепатита С (ВГС), обеспечивается проведением массового скрининга сыворотки крови на наличие антител к ВГС (анти-ВГС) в тест-системах на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Определенные трудности интерпретации результатов, которые возникают при исследовании позитивных образцов с низкой оптической плотностью (ОП), в ряде случаев могут быть преодолены при использовании более специфических подтверждающих тестов. Так, в США в качестве дополнительного метода, подтверждающего наличие анти-ВГС в образцах, рекомендовано использовать иммуноблот (ИБ) RIBA-III [5]. В РФ обязательным является подтверждение наличия анти-ВГС в иммуноферментных тест-системах планшетного формата (ИФТС) с разделным выявлением антител к структурному нуклеокапсидному антигену (анти-Core) и комплексу неструктурных антигенов (анти-NS) ВГС [3]. В лабораторной практике специализированных кли-

ник используют ИФТС с разделным выявлением антител к нуклеокапсидному (Core) протеину и к трем неструктурным протеинам: NS3, NS4, NS5 ВГС [1]. Core-протеин является одним из наиболее иммуногенных антигенов ВГС [2], однако причиной низкой позитивной ОП по анти-Core в ИФТС может быть неспецифическая реактивность сыворотки [7].

В последнее время появился новый класс препаратов для серодиагностики инфекционных заболеваний – иммуночипы, принцип работы которых основан на прямом методе выявления антител к спектру антигенов с помощью флуоресцентной детекции. Эффективность иммуночипов была продемонстрирована на стандартных коммерческих панелях проб, содержащих и не содержащих анти-ВГС, а также при исследовании образцов сыворотки крови, положительных по анти-ВГС в ИФТС с разной ОП [5].

В представленной работе были изучены диагностические возможности иммуночипов в целях верификации наличия маркеров вирусного гепатита С при слабой позитивной реакции сыворотки крови на Core-антиген в ИФА и ИБ.

Материалы и методы. Исследованы образцы сыворотки крови, направленные из разных лечебно-профилактических учреждений Москвы в лабораторию, в которой проводится массовый скрининг на маркеры вирусных гепатитов. Выявление анти-ВГС проводили с помощью лицензированных ИФТС по двухэтапной схеме [3]. На первом этапе (при скрининге) была использована ИФТС "РекомбиБест-анти-ВГС" (ЗАО "ВекторБест", Новосибирск) с комплексной сорбцией антигенов ВГС. На втором этапе (после обнаружения анти-ВГС в скрининге) использовали ИФТС

Для корреспонденции:

Потапова Александра Анатольевна, канд. биол. наук, врач клин.-иммунол. лаб. по диагностике ВИЧ-инфекции

Адрес: 117071, Москва, Ленинский пр-т, 17

Телефон: (495) 955-64-03

E-mail: aapotapova@mail.ru

с раздельной сорбцией Core-антигена и комплекса NS антигенов: "РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест" (ЗАО "ВекторБест", Новосибирск). Позитивные образцы с низкой ОП в скрининге и в подтверждающей ИФТС, согласно ранее разработанному алгоритму [4], были дополнительно исследованы в ИФТС "РекомбиБест анти-ВГС-спектр" с раздельной сорбцией четырех антигенов ВГС: Core, NS3, NS4, NS5, а также в тест-системе ЛИА (линейный иммуноанализ – разновидность иммунного блоттинга с раздельной иммобилизацией рекомбинантных антигенов на мембране) INNO-LIA HCV Ab III update (Innogenetics, Бельгия) и в ИБ Recomblot HCV IgG 2.0 (Mikrogen, Германия). Значение коэффициента позитивности (КП) в ИФА (КП_{ИФА}) рассчитывали по отношению величины ОП контрольного образца к ОП критической; данные представлены в виде $\bar{X} \pm \sigma$. Статистическая обработка проведена с помощью программы Excel.

Образцы с низким КП по анти-Core, кроме ИБ и ЛИА, были дополнительно исследованы в иммуночипах. Принцип работы иммуночипов был подробно описан ранее [5]. Для настоящей работы в ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора была подготовлена экспериментальная серия иммуночипов – диагностических наборов, включающих иммуносорбент (микроскопические слайды с иммобилизованными антигенами ВГС), раствор для разведения образцов, концентрат конъюгата, раствор для промывки иммуносорбента, положительный и отрицательные контрольные образцы. В пределах каждого эррея – ограниченной зоны на слайде, предназначенной для проведения анализа одного клинического или контрольного образца, – были иммобилизованы антигены ВГС, относящиеся к генотипам 1b и 3a: Core-3a; Core-1b, NS3-3a, NS3-1b, c-100 (участок NS4), m-5-1-3a, m-5-1-1b (участок NS4), NS5-3a, NS5-1b. Каждому антигену соответствовал индивидуальный спот (пятно) в двух повторях. На одном микроскопном слайде формировали 12 индивидуальных эрреев. Дизайн иммуночипа представлен на рисунке.

На канале Cy5/Red детектировали специфические иммуноглобулины (Ig) класса G, на канале Cy3/Green детектировали специфические Ig класса M. Для каждого спота рассчитывали коэффициент K, представляющий собой отношение абсолютного значения флуоресценции 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 K в эррее с внесенным контрольным отрицательным образцом тест-системы (К-) на два. Для каждого иммобилизованного антигена рассчитывали КП антител в иммуночипах (КП_{ИЧ}) как отношение среднего значения K к соответствующему cut off. Положительным результатом на наличие антител к определенному антигену в исследуемом образце считали те показатели, при которых КП_{ИЧ} был равен 1,1 или больше.

В состав иммуносорбента входило 9 иммуногенных антигенов, которые можно отнести к четырем группам антигенов ВГС: Core, NS3, NS4, NS5. Образец считали содержащим антитела к ВГС, если значения КП_{ИЧ} были равны 1,1 или больше для двух и более групп антигенов ВГС. Результат исследования образца считали неопределенным при выявлении положительного КП_{ИЧ} только для одной группы антигенов. Образец считали отрицательным, если значения КП_{ИЧ} для всех иммобилизованных антигенов были меньше 1,1.

В иммуночипе было исследовано 16 образцов с низким КП анти-Core в ИФТС. Контрольную группу составили 60 образцов с отрицательным результатом тестирования анти-ВГС в ИФТС.

Результаты и обсуждение. По результатам первичного скрининга и подтверждающего исследова-

ния в ИФА было выбрано 16 проб с низким КП_{ИФА} по анти-Core ВГС, при этом результат исследования в ИБ/ЛИА был положительным, неопределенным либо отрицательным в соответствии с правилами интерпретации соответствующего теста (табл. 1).

В скрининговых ИФТС средний КП_{ИФА} анти-ВГС в группе из 16 образцов составлял $2,62 \pm 0,81$, в подтверждающих ИФТС КП_{ИФА} для анти-Core – $1,95 \pm 0,876$.

В ИБ все 16 образцов с разной интенсивностью реагировали на антигены Core-протеина ВГС, однако по правилам интерпретации результата из 16 проб, которые в ИФТС были признаны анти-ВГС-положительными вследствие наличия анти-Core, в ИБ результат исследования 2 проб был положительным, 9 проб – неопределенным и 5 проб – отрицательным. Эти образцы были дополнительно изучены в иммуночипах производства ЦНИИ эпидемиологии с раздельно иммобилизованными антигенами (Core-1b, Core-3a, NS3-1b, NS3-3a, c-100, m-5-1-1b, m-5-1-3a, NS5-1b, NS5-3a) и раздельным выявлением антител классов M и G. Результаты тестирования в иммуночипах 16 образцов, ранее исследованных в ИФА, представлены в табл. 2.

Из 16 образцов, позитивных в подтверждающих ИФТС по наличию анти-Core, в иммуночипах (см. табл. 2) антитела к Core класса G детектировались в 12 (75%) образцах (пробы № 1, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Кроме того, в 11 (68,8%) образцах дополнительно были обнаружены анти-NS3 (№ 1, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), в 9 (56,3%) – анти-NS4 (№ 1, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15), в 3 (18,8%) – анти-NS5 (№ 4, 12, 13).

При тестировании в иммуночипах анти-ВГС класса G в 4 образцах (№ 2, 3, 5, 10) в иммуночипах детектировались антитела не к Core, а к неструктурным протеинам ВГС; при этом вследствие выявления антител к антигенам нескольких неструктурных протеинов ВГС результат исследования двух проб был положительным (№ 2 и 10), а двух других – неопределенным.

В целом при тестировании анти-ВГС класса G в иммуночипах в 13 образцах из 16 результат был интерпретирован как положительный, а в 3 как неопределенный, поскольку детектировались антитела только к одному из структурных (№ 6) или неструктурных (№ 3 и 5) антигенов ВГС.

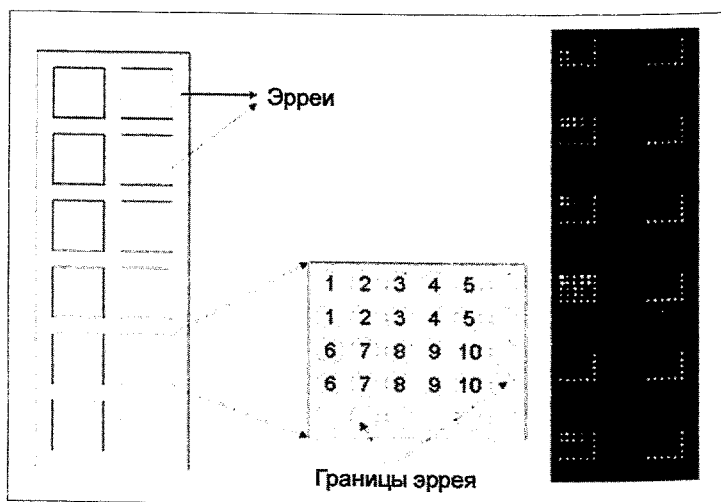


Схема иммуносорбента иммуночипа и пример его флуоресцентного изображения на канале Cy5 (Red), где 1 – споты, содержащие соответственно антиген: 1 – NS3-3a, 2 – NS3-1b, 3 – c-100, 4 – m-5-1-3a, 5 – m-5-1-1b, 6 – NS5-3a, 7 – NS5-1b, 8 – Core-3a, 9 – Core-1b, 10 – сорбционный буфер, не содержащий антигены ВГС. Границы эррея – споты, содержащие бычий сывороточный альбумин, меченный флуорофорами Cy5 и Cy3.

Таблица 1

Результаты исследования образцов сыворотки крови с низким КП по анти-Core в ИФТС с раздельным выявлением антител к Core, NS3, NS4, NS5 антигенам ВГС ("Вектор Бест анти-ВГС") в ИБ Recomblot HCV IgG 2.0 (Mikrogen, Германия) и в INNO-LIA HCV Ab III update (Innogenetics, Бельгия)

№ п/п	Пол	Возраст, годы	Код *	КП _{ИБ} по анти-Core в ИФТС, результат положительный	Реактивность к антигенам ВГС в ИБ**	Результат в ИБ
1	Ж.	27	11	1,77	Core, 5 баллов	Отрицательный
2	Ж.	45	11	1,00	То же	То же
3	Ж.	33	2	3,42	" "	" "
4	Ж.	36	8	1,31	" "	" "
5	Ж.	17	11	3,61	" "	" "
6	Ж.	22	2	1,66	Core, 8 баллов	Неопределенный
7	Ж.	25	4	2,40	То же	То же
8	Ж.	78	11	1,08	" "	" "
9	М.	17	11	1,28	" "	" "
10	М.	47	11	1,48	" "	" "
11**	Ж.	37	11	1,60	C1(+/-), C2(+/-)	Положительный
12	Ж.	78	11	1,6	Core, NS3, NS4, геликаза, 14 баллов	То же
13	Ж.	49	6	2,2	Core, 8 баллов	Неопределенный
14	Ж.	34	11	1,28	То же	То же
15	М.	52	11	1,92	" "	" "
16	М.	32	11	3,55	" "	" "

Примечание. * – код контингента: 2 – беременные; 4 – медицинские работники; 6 – заболевание печени; 8 – пациент кожно-венерологического диспансера; 11 – обследование по общим показаниям; ** – образец № 11 исследован в INNO-LIA HCV Ab III update, прочие образцы – в Recomblot HCV IgG 2.0.

Следует отметить, что при тестировании в иммуночипах 16 образцов на наличие анти-ВГС класса М результат исследования 8 образцов (50%) был отрицательным. В 7 образцах результат исследования IgM был неопределенным, причем в трех пробах с низкой позитивностью (№ 8, 9, 12) детектировались анти-Core ВГС, в двух пробах (№ 3 и 7) – анти-NS5, в пробе № 16 – анти-NS4 и в пробе № 10 – анти-NS3 ВГ; результат исследования одной пробы (№ 14) был позитивным по наличию анти-NS-3 и анти-NS4 (см. табл. 2).

В контрольной группе из 60 образцов с отрицательным результатом тестирования анти-ВГС в ИФТС в иммуночипах анти-ВГС также не выявлялись.

При выявлении в ИФА положительной реактивности сыворотки крови пациента только к одному антигену ВГС в большинстве случаев отсутствуют сведения о моменте заражения вирусом и не обнаруживаются клинические проявления болезни, биохимические показатели находятся в пределах нормы, результаты тестирования РНК и самих антигенов ВГС являются отрицательными. Сказанное выше затрудняет ответ на вопрос, обусловлена ли реактивность наличием истинных антител к ВГС либо неспецифической реакцией сыворотки крови.

Анализ результатов ИФА и ИБ привел исследователей к выводу о том, что при выявлении в пробе антител к единственному антигену ВГС [8], а также при низкой величине ОП пробы в ИФА велик риск ложноположительного результата [6].

В настоящей работе были изучены образцы с факторами риска ложноположительными: величина КП_{ИБ} в скрининге была низкой (в среднем $2,62 \pm 0,81$), а в подтверждающих ИФТС обнаруживалась реактивность только к Core-антигену (КП_{ИБ} $1,95 \pm 0,876$). Ранее нами было показано, что образцы

Таблица 2

Результат исследования в иммуночипах с раздельным выявлением IgG и IgM образцов сыворотки крови с низким коэффициентом позитивности по анти-Core ВГС в ИФТС

№ п/п	Антигены ВГС, к которым выявлены IgM (КП _{ИБ}); результат определения анти-ВГС класса М	Антигены ВГС, к которым выявлены IgG (КП _{ИБ}); результат определения анти-ВГС класса G
1	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (15,9), Core-1b (11,2), NS3-1b (1,1), m5-1-1 1b (3,5); положительный
2	Не обнаружены; отрицательный	NS3-3a (3,2), NS5-3a (2,1), NS5-1b (7,4); положительный
3	NS5-1b (1,7); неопределенный	NS3-3a (2,5); неопределенный
4	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (14,9), Core-1b (3,8), NS3-3a (6,3), NS3-1b (13,8), m5-1-1 3a (13,2), m5-1-1 1b (37,9), NS5-1b (1,5); положительный
5	Не обнаружены; отрицательный	m5-1-1 1b (15,5); неопределенный
6	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (32,5), Core-1b (18,7) неопределенный
7	NS5-3a (6,8); неопределенный	Core-3a (9,2), Core-1b (3,9), c-100 (4,9), m5-1-1 1b (4,4); положительный
8	Core-3a (1,2), Core-1b (1,1); неопределенный	Core-3a (11,8), Core-1b (2,4), NS3-1b (9,4), m5-1-1-1b (3,7); положительный
9	Core-3a (1,2), Core-1b (1,3); неопределенный	Core-3a (1,9), NS3-1b (1,5); положительный
10	NS3-1b (1,2); неопределенный	NS3-3a (4,1), NS3-1b (9,6), m5-1-1 3a (2,2), m5-1-1 1b (1,3); положительный
11	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (22), Core-1b (6,4), NS3-3a (3,7), NS3-1b (7,2), m5-1-1-3a (1,1); положительный
12	Core-3a (1,2), Core-1b (1,1); неопределенный	Core-3a (2,2), Core-1b (1,1), NS3-1b (17,1), c-100 (69,6), m5-1-1 1b (2,7), NS5-1b (1,2); положительный
13	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (47,6), Core-1b (12,1), NS3-3a (11,7), NS3-1b (31,2), m5-1-1 3a (6,6), m5-1-1-1b (14,5), NS5-1a (1,2), NS5-1b (3,9); положительный
14	NS3-1b (4), m5-1-1b (1,2); положительный	Core-3a (8,2), Core-1b (4,4), NS3-1b (11,4), c-100 (12,1), m5-1-1 3a (2), m5-1-1 1b (2,3); положительный
15	Не обнаружены; отрицательный	Core-3a (24,7), Core-1b (4,4), NS3-1b (7,1), c-100 (5,1), m5-1-1 1b (8,2); положительный
16	m5-1-1 3a (4,5), неопределенный	Core-3a (2), NS3-3a (1,4), NS3-1b (7,1), m5-1-1 1b (15,6); положительный

с КП по анти-Core менее 2,5 целесообразно исследовать дополнительно, поскольку в разных ИФТС и в ИБ результаты исследования могут быть противоречивыми [4].

В представленной работе методом ИБ были обнаружены анти-Core во всех 16 образцах, но результат исследования зависел от концентрации указанных антител (что отражалось на интенсивности окрашивания соответствующей антигенной полосы), а также от наличия дополнительно выявленных маркеров ВГС-инфекции (обнаружены только в одном образце). В результате в ИБ результаты исследования следовало интерпретировать как положительные в 2 (12,5%) образцах, как неопределенные – в 9 (56,25%), как отрицательные – в 5 (31,25%).

В иммуночипах в 12 (76,9%) из 16 образцов были выявлены анти-Core класса G. Следует отметить, что в 4 образцах анти-Core в иммуночипе не были обнаружены, причем в 3 из них (№ 2, 3 и 5) в ИБ степень окрашивания полосы с Core-антигеном также соответствовала отрицательному результату тестирования. Вместе с тем вследствие выявления в иммуночипах в указанных пробах антител к различным неструктурным антигенам ВГС результат исследования был неопределенным (пробы № 3 и 5) или положительным (проба № 2). В целом после тестирования в иммуночипах 16 образцов 13 (81%) из них были признаны анти-ВГС-содержащими, результаты тестирования 3 образцов были признаны неопределенными. Антитела к неструктурным антигенам ВГС при исследовании в иммуночипах были выявлены в 15 (93,8%) из 16 проб, причем в 4 (25%) пробах были выявлены антитела к одному неструктурному антигену, в 8 (50%) пробах – антитела к двум неструктурным антигенам, в 4 (25%) – к трем неструктурным антигенам. Следовательно, нами была установлена сходная чувствительность иммуночипа и ИБ/ЛИА по способности детекции антител к Core. Кроме того, мы наблюдали высокий процент определения антител к неструктурным антигенам в иммуночипах в отли-

чие от скрининговых и верификационных тест-систем, что позволило некоторые образцы сывороток признать положительными по содержанию анти-ВГС.

Таким образом, тест-системы в формате иммуночипа позволяют успешно проводить верификацию результатов тестирования на наличие анти-ВГС класса G образцов с низким содержанием антител, в частности к Core.

Обнаружение с помощью иммуночипа в одном из 16 образцов антител, относящихся к IgM, требует проведения дополнительных исследований с целью подтверждения диагностических возможностей иммуночипов по выявлению среди пациентов с низкими значениями позитивности анти-Core у больных с активной ВГС-инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаева Л. И., Михайлов М. И., Блохина Н. П. и др. // Эпидемиол. и инфекц. бол. – 2004. – № 5. – С. 37–42.
2. Николаева Л. И. Специфический гуморальный иммунитет при вирусном гепатите С: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М, 2006.
3. О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека. Приказ МЗ РФ № 322 от 21.10.2002. – М., 2002.
4. Потапова А. А., Редченко Е. Б., Науменко В. А. // Мир вирусных гепатитов. – 2008. – № 4. – С. 8–12.
5. Чекалова Т. А., Маркелов М. Л., Маизенюк И. Н. и др. // Клини. лаб. диагн. – 2008. – № 6. – С. 25–30.
6. Alter M. J., Kuhnert W. L., Finelli L. // MMWR Recomm. Rep. – 2003. – Vol. 52 (RR-3). – P. 1–13.
7. León P., López J. A., Elola C. et al. // Vox Sang. – 1998. – Vol. 75, N 1. – P. 32–36.
8. Piro L., Solinas S., Luciani M. et al. // Blood Transfus. – 2008. – Vol. 6, N 2. – P. 107–111.

Поступила 22.08.11

РА Регионарная анестезия и лечение острой боли

Журнал
«Регионарная анестезия
и лечение острой боли»
в издательстве «Медицина» с 2013 г.