

2
НОМЕР



ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УрО РАН



2016

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УрО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 616.927

М.Д. Кропанева¹, М.Б. Раев^{1,2}, П.В. Храмцов^{1,2}

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Цель. Определение оптимальных условий детекции антител к антигену p15 *Treponema pallidum* в сыворотке крови человека при помощи углеродных наночастиц, функционализированных G-белком стрептококка.

Материалы и методы. Детекцию иммуноглобулинов G производили при помощи углеродного диагностикума: частиц коллоидного угля, ковалентно конъюгированных с G-белком стрептококка. Условия анализа подбирали, оценивая соотношение интенсивности сигнала в позитивном и негативном контрольных образцах при помощи сканирования тест-полосок и последующей цифровой обработки полученных изображений.

Результаты. Наибольшая интенсивность сигнала была достигнута при часовой детекции иммуноглобулинов G углеродным диагностикумом с титром 1/90. Наилучший блокирующий эффект был достигнут при использовании 1%-ного раствора БСА в PBS. Оптимальной для сенсibilизации твердой фазы является концентрация антигена p15 0,025 мг/мл. Оптимальный для качественной детекции антител к антигену p15 титр исследуемой сыворотки крови равен 1/40.

Заключение. Результаты исследования образцов из референсной панели сывороток продемонстрировало перспективность дальнейшего совершенствования сконструированной тест-системы и проведения испытаний с использованием клинического материала.

Ключевые слова: сифилис, диагностика, дот-иммуноанализ, углеродные наночастицы.

M.D. Kropaneva¹, M.B. Rayev^{1,2}, P.V. Khramtsov^{1,2}

DEVELOPMENT OF SYPHILIS TEST-SYSTEM

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS, Perm, Russia

Objective. To determine optimal conditions to detect antibodies against *Treponema pallidum* antigen p15 in human blood serum using carbon nanoparticles functionalized with streptococcal protein G

Materials and methods. Human IgGs were detected by carbon diagnosticum: particles of colloidal carbon covalently conjugated with streptococcal protein G. Assay conditions were determined by measuring P/N signal ratio in control samples with the aid of test strips scanning and subsequent computer analysis of obtained images.

Results. The highest signal intensity was achieved after one-hour-long detection of IgGs by carbon diagnosticum with the titer of 1/90. One percent BSA solution in PBS provided the most efficient blocking effect. Concentration of p15 antigen of 0,025mg/ml was optimal for solid phase sensibilization. Optimal for qualitative detection of anti-p15 titer of serum is 1/40.

Conclusion. Testing of reference human sera from control panel demonstrated prospects of further development of test-system and necessity of testing of clinical serum samples.

Keywords: syphilis, diagnosis, dot-immunoassay, carbon nanoparticles.

Введение

Сифилис – заболевание, передающееся половым путем. Возбудителем сифилиса является бактерия *Treponema pallidum*. Данная инфекция распространена во всем мире и остается важной проблемой [1]. В Российской Федерации уровень заболеваемости сифилисом продолжает оставаться высоким. Средний показатель по России составил 24,8 случаев на 100 000 населения. В то же время уровень заболеваемости сифилисом в Пермском крае почти в полтора раза превышает средний уровень по России: зарегистрировано 35,3 случаев сифилиса на 100 000 человек [2].

В сложившихся условиях перспективной является разработка аналитической системы на основе углеродного диагностикума, представляющего собой суспензию наноразмерных частиц углерода, конъюгированных с аффинным соединением посредством системы ковалентных связей. Подобные системы, ранее разработанные в лаборатории экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН, обладают простотой, оперативностью, специфичностью, достаточными для использования в качестве скрининговых тестов. Чувствительность их превосходит традиционные неинструментальные аналоги (РНГА, РА, РСК, реакции иммунодиффузии). Таким образом, аналитические системы на основе углеродных диагностикумов являются перспективными для создания высокочувствительных неинструментальных скрининговых тест-систем для диагностики сифилиса [3].

Целью данного исследования является определение оптимальных условий детекции антител к антигену p15 *Treponema pallidum* в сыворотке крови человека при помощи углеродных наночастиц, функционализированных G-белком стрептококка.

Задачи данной работы следующие: определение оптимального разведения детектирующего реагента; подбор времени инкубации с детектирующим реагентом; определение оптимальной концентрации антигена p15 *T. pallidum*; выбор блокирующего реагента для исключения неспецифического фонового сигнала; определение оптимального разведения сыворотки крови и времени инкубации с ней.

Материалы и методы

В качестве твердой фазы использовали полоски из нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 450 нм («Bio-Rad», США). Детекцию иммуноглобулинов G производили при помощи углеродного диагностикума: частиц

коллоидного угля, ковалентно конъюгированных с G-белком стрептококка («Sigma», США). Подробно синтез и структурно-функциональные свойства диагностикума рассмотрены в монографии [3].

Определение оптимального разведения детектирующего реагента проводилось следующим образом. На нитроцеллюлозные полоски наносили раствор иммуноглобулинов класса G (IgG, «Sigma», США) точками по 3 мкл в концентрации 0,05 мг/мл в забуференном фосфатами физиологическом растворе с 0,1% азидом натрия (PBS). Далее полоски 3-хкратно промывали PBS с твином-20 (PBST) и инкубировали их с детектирующим реагентом в разведениях 1/45, 1/90, 1/180, что соответствовало массовой доле частиц углерода 0,03, 0,015 и 0,007% соответственно. Инкубацию тест-полосок с диагностикумом проводили в течение 15, 30 и 60 минут.

Подбор оптимальных условий анализа сыворотки крови осуществляли следующим образом. На полоски сорбировали антиген p15 *T. pallidum* («Биосервис», Россия) дотами из капель по 3 мкл в концентрациях 0,05; 0,025; 0,01 мг/мл в PBS. После высушивания осуществляли блокирование неспецифических сайтов связывания 1%-ными растворами бычьего сывороточного альбумина (БСА), сухого обезжиренного молока и казеина (все «Sigma», США) в PBST в течение 60 минут. Затем полоски 3-хкратно промывали PBST и инкубировали их с пулом сывороток крови, содержащих или не содержащих антитела к *T. pallidum*, в разведениях 1/10, 1/40 и 1/160. Длительность инкубации была 15, 30 и 60 минут. По окончании инкубации проводили 3-хкратную промывку лунок планшета PBST. После промывки проводили инкубацию с детектирующим реагентом в разведении 1/90, продолжительностью 60 минут. Далее тест-полоски промывали, высушивали и сканировали. Результаты оценивали в программе для анализа изображений ImageJ (NIH, США). Оптимальными условиями анализа считали те, при которых отношение между показателями интенсивности окрашивания для положительной и отрицательной сыворотки было наибольшим.

Результаты и обсуждение

В результате анализа полученных данных об интенсивности окрашивания были подобраны оптимальные условия выявления в сыворотке крови антител, специфичных к антигену возбудителя сифилиса. Наибольшая интенсивность сигнала была достигнута при часовой детекции иммуноглобулинов G углеродным диагностикумом с титром 1/90, что соответствует concentra-

ции углеродных частиц 0,015% по массе.

Наилучший блокирующий эффект достигался при использовании 1% раствора БСА в PBS. Интенсивность окрашивания при блокировании твердой фазы растворами сухого молока и казеина была значительно ниже (рис. 1).

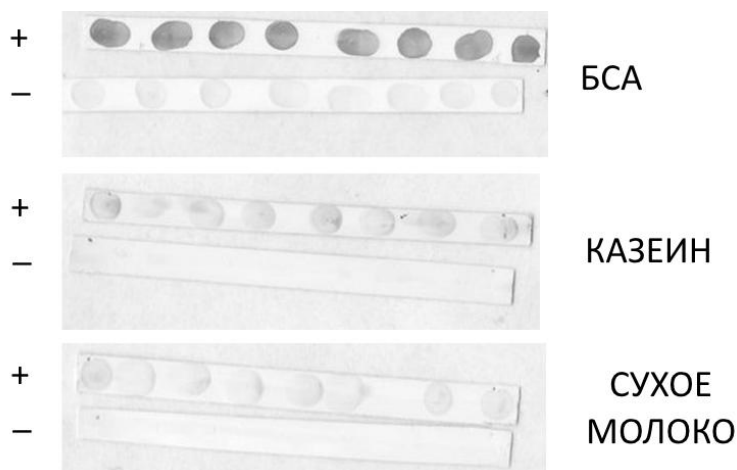


Рис. 1. Влияние различных блокирующих реагентов на интенсивность сигнала.

Примечание: «+» – позитивный образец, «-» – негативный образец.

Оптимальной для сенсibilизации твердой фазы является концентрация антигена p15 0,025 мг/мл. Наивысшее соотношение интенсивностей сигналов при исследовании позитивного и негативного образцов сыворотки крови было достигнуто в ходе их 15-минутной инкубации с иммуносорбентом. Оптимальный для качественной детекции антител к антигену p15 титр исследуемой сыворотки крови равен 1/40.

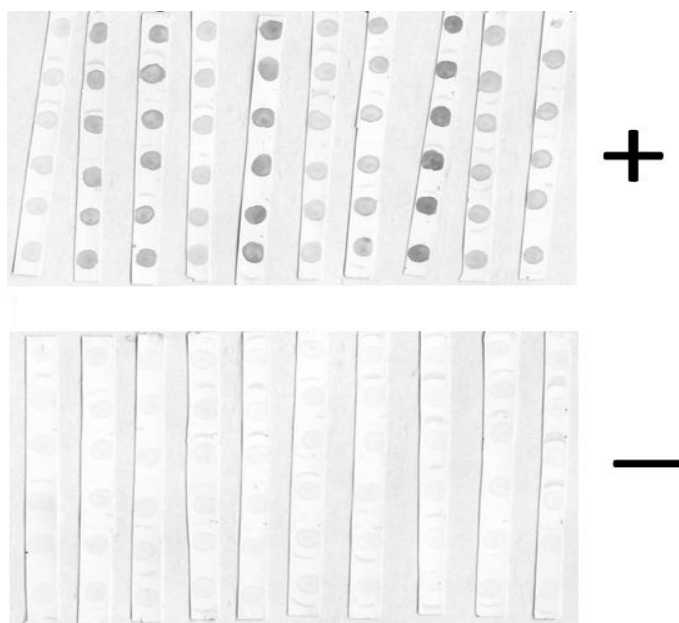


Рис. 2. Результаты тестирования референсных сывороток крови из стандартной панели при помощи сконструированной тест-системы.

Примечание: «+» – позитивные образцы, «-» – негативные образцы.

После того, как были подобраны условия анализа антител, тест-система прошла тестирование при помощи стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к возбудителю сифилиса («МедБиолСоюз», Россия). Всего было протестировано 10 положительных и 10 отрицательных референсных образцов, анализ не выявил ни ложнопозитивных, ни ложнонегативных результатов (рис. 2).

Заключение

На настоящий момент разработано множество тест-систем, предназначенных для серодиагностики сифилиса [3]. Это иммуноферментные [4], иммунохроматографические тесты [5], диагностические методы на основе биосенсоров [6]. Ключевым отличием предложенного теста от перечисленных разработок является использование для детекции комплексов «антиген-антитело» диагностикума на основе углеродных наночастиц. К преимуществам углеродного диагностикума относятся его стабильность, высокая интенсивность окрашивания метки. Существенной особенностью исследования является использование для оценки результатов анализа сканирующего оборудования, что повышает их объективность и делает постановку анализа более оперативной и простой. Результаты исследования образцов из референсной панели сывороток продемонстрировали перспективность дальнейшего совершенствования сконструированной тест-системы и проведения испытаний с использованием клинического материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sato N. Syphilis – Recognition, Description and Diagnosis. Rijeka: InTech. 2011. 138 p.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Пермском крае в 2014 году». Управление Роспотребнадзора по Пермскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае». 2015. 257 с.
3. Morshed M., Singh A. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clin. Vaccine Immunol. 2015. 22 (2): 137-147.
4. Xu M., Xie Y., Jiang C. et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. International Journal of Infectious Diseases. 2016. 43: 51-57.
5. Lin L., Fu Z., Dan B. et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to Treponema pallidum with TPN17 and TPN47. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 68 (3): 193-200.
6. Huang N., Ye L., Schneider M. et al. Development of a novel protein biochip enabling validation of immunological assays and detection of serum IgG and IgM antibodies against Treponema pallidum pathogens in the patients with syphilis. Biosensors and Bioelectronics. 2016. 75: 465-471.

Поступила 18.05.2016

(Контактная информация: **Кропанева Мария Дмитриевна** – студент кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: kropanevamasha@gmail.com;

Раев Михаил Борисович – д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: mraev@iegm.ru;

Храмцов Павел Викторович – ассистент кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: khramtsovpavel@yandex.ru)

LITERATURA

1. Sato N. Syphilis – Recognition, Description and Diagnosis. Rijeka: InTech. 2011. 138 p.
2. State report «About sanitary and epidemiological welfare of population of Perm Region in 2014». Office of Rospotrebnadzor in Perm Region, SBIH «Center of hygiene and epidemiology of Perm Region». 2015. 257.
3. Morshed M., Singh A. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clin. Vaccine Immunol. 2015. 22 (2): 137-147.
4. Xu M., Xie Y., Jiang C. et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. International Journal of Infectious Diseases. 2016. 43: 51-57.
5. Lin L., Fu Z., Dan B. et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to Treponema pallidum with TPN17 and TPN47. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 68 (3): 193-200.
6. Huang N., Ye L., Schneider M. et al. Development of a novel protein biochip enabling validation of immunological assays and detection of serum IgG and IgM antibodies against Treponema pallidum pathogens in the patients with syphilis. Biosensors and Bioelectronics. 2016. 75: 465-471.

Образец ссылки на статью:

Кропанева М.Д., Раев М.Б., Храмцов П.В. Разработка тест-системы для диагностики сифилиса. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 6с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MDK-2016-2.pdf>).