

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.2-002.1-022:578.826]-078

Иванова И.А.<sup>1</sup>, Писарева М.М.<sup>1</sup>, Леонтьева Г.Ф.<sup>2</sup>, Смирнова Т.Д.<sup>1</sup>, Сорокин Е.В.<sup>1</sup>, Амосова И.В.<sup>1</sup>, Петрова Е.Р.<sup>1</sup>, Шалджян А.А.<sup>1</sup>, Сирош А.А.<sup>3</sup>, Майорова В.Г.<sup>1</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ ДОТ-МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ АДЕНОВИРУСА В КЛИНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФГБУ «Технологический университет», 197376, Санкт-Петербург, Российская Федерация

*В статье обоснована возможность применения точечного иммуноферментного анализа (дот-метода) для определения вирусных антигенов в материалах от больных. Для диагностики аденовирусной инфекции использовали конъюгат вирусспецифических моноклональных антител (МКА) и пероксидазы хрена. Хроматографическая очистка конъюгата от свободной пероксидазы позволяет снизить фоновую окраску нитроцеллюлозной мембраны и, следовательно, повысить чувствительность. Применение прямых конъюгатов на основе МКА повышает специфичность дот-метода и значительно сокращает время анализа. Как и при использовании прямых конъюгатов на основе поликлональной сыворотки, материалы от больных требуют предварительной обработки детергентом для предотвращения неспецифических реакций. Дот-метод демонстрирует хорошее совпадение с данными полимеразной цепной реакции и после клинических испытаний может быть использован для диагностики вирусных инфекций у людей.*

Ключевые слова: дот-метод; вирус; инфекция; диагностика.

**Для цитирования:** Иванова И.А., Писарева М.М., Леонтьева Г.Ф., Смирнова Т.Д., Сорокин Е.В., Амосова И.В., Петрова Е.Р., Шалджян А.А., Сирош А.А., Майорова В.Г. Применение дот-метода для определения антигенов аденовируса в клинических материалах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (2): 122-125.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-2-122-125.

Ivanova I.A.<sup>1</sup>, Pisareva M.M.<sup>1</sup>, Leontieva G.F.<sup>2</sup>, Smirnova T.D.<sup>1</sup>, Sorokin E.V.<sup>1</sup>, Amosova I.V.<sup>1</sup>, Petrova E.R.<sup>1</sup>, Shaldjian A.A.<sup>1</sup>, Sirosh A.A.<sup>3</sup>, Maiorova V.G.<sup>1</sup>

### THE APPLICATION OF DOT-TECHNIQUE FOR DETECTING ANTIGENS OF ADENOVIRUS IN CLINICAL SAMPLES

<sup>1</sup>The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, <sup>2</sup>97376 St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>The research institute of experimental medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>The technological university, 197376 St. Petersburg, Russia

*The article substantiates possibility of application of point enzyme-linked immunosorbent assay (dot-technique) for detecting viral antigens in samples from patients. To diagnose adenovirus infection conjugate of virus-specific monoclonal antibodies and peroxidase of horse-radish were used. The chromatographic rectification of conjugate from free peroxidase permits diminishing background coloring of nitrocellulose membrane and therefore to increase sensitivity. The application of direct conjugates on the basis of virus-specific monoclonal antibodies increases specificity of dot-technique and significantly shortens time period of analysis. As in case of application of direct conjugates on the basis of polyclonal serum, samples from patients require preliminary processing with detergent for preventing non-specific reactions. The dot-technique demonstrates good coincidence with data of polymerase chain reaction and after clinical trials it can be used in diagnostic of human viral infections.*

Key words: dot-technique; virus; infection; diagnostic

**For citation:** Ivanova I.A., Pisareva M.M., Leontieva G.F., Smirnova T.D., Sorokin E.V., Amosova I.V., Petrova E.R., Shaldjian A.A., Sirosh A.A., Maiorova V.G. The application of dot-technique for detecting antigens of adenovirus in clinical samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2016; 61 (2): 122-125. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-2-122-125.

For correspondence: Ivanova I.A. e-mail: ivanovainna-2011@mail.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 27.05.15

Accepted 15.12.15

**Введение.** Дот-метод успешно применяли для выявления антигенов вируса гриппа в тканях животных в конце 80-х – начале 90-х годов прошлого века [1, 2].

Метод имеет ряд преимуществ перед иммуноферментным анализом (ИФА), так как нитроцеллюлозная мембрана (НЦМ) обладает большей сорбционной емкостью по сравнению с полистиролом. Эффективность метода повысилась

при использовании прямого антивирусного пероксидазного конъюгата в качестве зонда. Метод отличается простотой исполнения, дешевизной, низким уровнем фонового окрашивания, чувствительностью, достаточной для выявления вирусных антигенов как в период острой инфекции, так и в случаях персистенции, возможностью визуального учета результатов без использования специального оборудования. В

Для корреспонденции: Иванова Инна Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ivanovainna-2011@mail.ru

настоящее время в связи с развитием технологии получения моноклональных антител (МКА) метод стал более специфичным и может быть использован для диагностики вирусных инфекций в остром периоде у людей. Вместе с тем оказалось, что прямой пероксидазный конъюгат на основе МКА, как и поликлональный, может неспецифически реагировать с носоглоточными смывами (НГС) от больных ОРВИ. В статье описан способ устранения подобной неспецифической реакции и основные направления для сокращения продолжительности анализа.

*Материал и методы.* Вирусосодержащую культуральную жидкость и очищенный концентрат (ОК) аденовируса типа 6, штамм Tonsill, получали согласно описанному в работе [3] методу. Вирусосодержащую аллантаоисную жидкость и ОК вируса гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2) также получали согласно приведенному в работе [3] методу. Аденовирусный гексонный антиген получали методом, описанным в работе [4]. МКА 6/1 и 6D11 получали согласно указаниям в работе [5]. НГС от больных ОРВИ были предоставлены лабораторией молекулярной генетики вирусов и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа». Конъюгат МКА и пероксидазы хрена 6/1-Пх был получен и очищен в соответствии с описанием в работе [2]. Конъюгат МКА и пероксидазы хрена 6D11-Пх получали и очищали также в соответствии с приведенным в работе [2] методом.

Реакцию торможения гемагглютинации и ИФА для изучения специфичности МКА проводили методом, указанным в работах [6, 7]. Обработку биологических образцов детергентом твином-20 (10% маточный раствор) выполняли в планшете для иммунологических реакций («Медполимер», Санкт-Петербург), в который вносили НГС и детергент в конечной концентрации 0,1%. Перед нанесением исследуемых образцов на НЦМ планшет с ними выдерживали 1 ч при 4°C.

Аналитическую чувствительность дот-метода определяли, используя ОК аденовируса и 6/1-Пх и ОК вируса гриппа А для 6D11-Пх. ОК вирусов разводили в дистиллированной воде или дистиллированной воде с 0,1% твином-20 от 100 мкг/мл до 10 нг/мл с шагом 10 и после инкубации в течение 1 ч при 4°C наносили на НЦМ в объеме 3 мкл. НЦМ высушивали при 20°C, затем блокировали 10% обезжиренным молоком (торговой марки «Буренка») в течение 1 ч при 37°C, после чего инкубировали с раствором соответствующего конъюгата (1:100), разведенным на 5% обезжиренном молоке той же марки в течение 12 ч при 4°C. Затем нитроцеллюлозный фильтр отмывали трехкратно фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с pH 7,0, неоднократно ацетат-цитратным буфером (АЦБ) с pH 5,0 (по 10 мин на шейкере), помещали на 10 мин в 1% раствор декстран-сульфата (мол. масса 4000 Д, «Sigma») на АЦБ. Фильтры трехкратно отмывали АЦБ от свободного декстран-сульфата и окрашивали в 0,05% растворе тетраметилбензидина (ТМБ) на АЦБ в присутствии 0,0125% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. НЦМ обрабатывали декстран-сульфатом для перевода ТМБ в нерастворимую форму. Окрашивание проводили в течение 10–15 мин. Реакцию останавливали, промывая фильтр дистиллированной водой.

Данные о полимеразной цепной реакции (ПЦР) были предоставлены лабораторией молекулярной генетики и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа».

Чтобы повысить чувствительность дот-метода, при определении вирусных антигенов у больных ОРВИ обработанные или необработанные детергентом носоглоточные смывы наносили на НЦМ в объеме 12 мкл. Нанесение осуществляли дробно, по 3 мкл, 4 раза в одну точку, каждый раз дожидаясь полного выпитывания жидкости. Контролем служили НГС, отрицательные в ПЦР по аденовирусу. После высушивания при 20°C НЦМ блокировали, как указано выше, и устраняли собственную пероксидазную активность биологических

образцов. Для этого НЦМ помещали в 4% раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 5% обезжиренном молоке и выдерживали 10 мин при 20°C. Затем НЦМ отмывали 4 раза по 10 мин ФСБ и переносили в кювету, содержащую раствор необходимого конъюгата в рабочем разведении. Дальнейшие действия выполняли, как указано выше.

Для выявления генетического материала аденовирусов групп В, С и Е в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени использовали набор реагентов Ампли-Сенс® ОРВИ-скрин-FL с гибридизационно-флюоресцентной детекцией («ИнтерЛабСервис», Москва) на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Австралия).

*Результаты и обсуждение.* ФГБУ «НИИ гриппа» располагает коллекцией МКА, специфичных к вирусам, вызывающим ОРВИ. Используемые в настоящей работе МКА 6/1 направлены к группоспецифическому антигену гексона аденовируса [4]. Материалом для иммунизации служил очищенный кристаллический гексонный антиген аденовируса типа 6, штамм Tonsill (рис.1). МКА 6/1 были химически связаны с пероксидазой хрена и дополнительно хроматографически очищены от свободных молекул пероксидазы на сефакириле S-200 согласно данным работы [6]. Оценка аналитической чувствительности конъюгата 6/1-Пх показала, что в антигензахватывающем ИФА и в исследовании дот-методом ее значение составляет 10 нг/мл ОК аденовируса типа 6. Направленность конъюгата была доказана в ИФА в серии модельных экспериментов с другими группами и типами аденовирусов и вирусами других семейств и родов [4].

Следующим этапом работы было доказательство специфичности дот-метода при исследовании НГС. Проверка включала несколько этапов. Вначале исследовали возможность неспецифического окрашивания НГС за счет собственной пероксидазной активности. 10 образцов НГС (5 положительных и 5 отрицательных в ПЦР) было проверено на собственную пероксидазную активность. Для этого НГС наносили на НЦМ, как описано выше, и окрашивали ТМБ в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (см. «Материал и методы»), исключив стадию обработки конъюгатом. Все исследуемые НГС окрашивались в разной степени. Это указывало на то, что собственная пероксидазная активность образцов вносит существенный вклад в их неспецифическое окрашивание. Поэтому ввели этап обработки проб перекисью водорода (ингибирование реакции избытком субстрата). НЦМ с нанесенными пробами после блокировки обрабатывали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 4%, разведенной на 5% обезжиренном молоке. Фильтры выдерживали в растворе 10 мин, затем отмывали 4 раза по 10 мин ФСБ и окрашивали согласно разделу «Материалы и методы». Параллельно определяли аналитическую чувствительность метода после обработки НЦМ перекисью водорода. Обработка 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> полностью ликвидировала собственную пероксидазную активность НГС и не влияла на аналитическую чувствительность метода.

Затем была проверена специфичность конъюгата 6/1-Пх в исследовании дот-методом. Для этого были обследованы 25 образцов НГС, предварительно охарактеризованных методом ПЦР. Для устранения собственной пероксидазной активности фильтр обрабатывали перекисью водорода, как описано выше. Тем не менее все НГС, как положительные, так и отрицательные в ПЦР, окрасились (рис. 2, а). Из литературы известно, что неспецифические реакции пероксидазных конъюгатов на основе МКА и биологических образцов удаляют посредством обработки материала неионными детергентами [8, 9]. Обычно рекомендуют использовать твин-20 в концентрации 2–4%, однако в нашем случае рекомендуемые дозы детергента полностью ингибируют специфическое связывание, и даже высокие концентрации ОК аденовируса (10 мкг/мл) не окрашиваются. Поэтому было исследовано влияние обработки ОК аденови-



Рис. 1. Гексонный антиген аденовируса серотипа 6 в кристаллическом виде. Ув. 100 (использован для получения МКА 6/1).

руса и НГС различными концентрациями твина-20. Оптимальной оказалась концентрация 0,1%, но даже в этом случае аналитическая чувствительность не превышала 100 нг/мл ОК аденовируса. Пример нитроцеллюлозного фильтра со специфически окрашенными НГС и ОК аденовируса в различных концентрациях приведен на рис. 2, б.

Следующим этапом работы стали клинические испытания дот-метода на основе конъюгата 6/1-Пх. Для этого использовали 52 образца НГС, предоставленные лабораторией молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа». Часть НГС содержала генетический материал аденовируса. Пробы были исследованы на содержание гексона аденовируса дот-методом. Данные приведены в таблице.

Из 32 положительных по результатам ПЦР проб 20 были положительными при дот-методе. Из 20 отрицательных по ПЦР НГС 15 были отрицательны при дот-методе. Соответственно индекс чувствительности дот-метода по отношению к ПЦР составил 0,63, индекс специфичности – 0,75; общее совпадение методов – 0,67. Рассматривая причины несова-

### Результаты сравнительного исследования НГС дот-методом и ПЦР

Положительные и отрицательные НГС в исследовании дот-методом	Положительные и отрицательные НГС в ПЦР	
	+	-
+	20	5
-	12	15

дения данных, полученных двумя методами, мы предположили, что отрицательный результат при дот-методе при оценке проб, положительных в ПЦР может быть связан с более низкой чувствительностью.

Косвенным показателем относительного содержания в пробе материала, выявляемого методом ПЦР, является величина Ct. Известно, что величина Ct пробы (англ. threshold cycle – число раундов амплификации, необходимое для достижения порогового значения) оказывается тем больше, чем меньше в ней искомого генетического материала. С учетом этого были проанализированы полученные результаты. Оказалось, что в массиве проб, положительных по данным ПЦР и отрицательных при дот-анализе, 58% проб имеют максимально высокий Ct- коэффициент, превышающий 20 (следовательно, и крайне низкое содержание материала в пробе), в то же время при совпадении результатов применения обоих методов доля таких проб составляет только 20%. Выявленная корреляция позволяет предположить, что причиной появления ложноотрицательных НГС в исследовании дот-методом, является его более низкая чувствительность по сравнению с ПЦР.

Появление специфической окраски в дот-анализе 5 образцов НГС, отрицательных в ПЦР, вероятно, объясняется наличием в образце веществ, ингибирующих реакцию, поскольку в трех из них отрицательным оказался и внутренний контроль.

Таким образом, дот-метод с использованием конъюгата аденоспецифических МКА 6/1-Пх, примененный нами для анализа клинических материалов, обеспечивал хорошее совпадение с ПЦР и обладал неплохими характеристиками – специфичностью, чувствительностью, простотой исполнения. Однако длительность анализа составляет около 16 ч, что является недостатком по сравнению с иммунохромато-

графическими тестами. Мы пытались сократить время за счет снижения продолжительности блокирования и выдержки с конъюгатом (30 мин). При этом конъюгат 6/1-Пх использовали в разведении 1:10 в микроколичестве (5 мкл на пятно разведенного ОК аденовируса). Аналогично быстрый способ детекции вирусных антигенов был проверен с 6D11-Пх. МКА 6D11 направлены к рибонуклеопротеину вируса гриппа А. Данные представлены на рис. 3. Проверка на перекрестную реакцию дала отрицательный результат.

Основными методами диагностики вирусных инфекций, предусматривающими определение вирусных антигенов в материалах от больных, являются иммунофлюоресценция (ИФЛ) и антигензахватывающий ИФА (АЗ-ИФА).

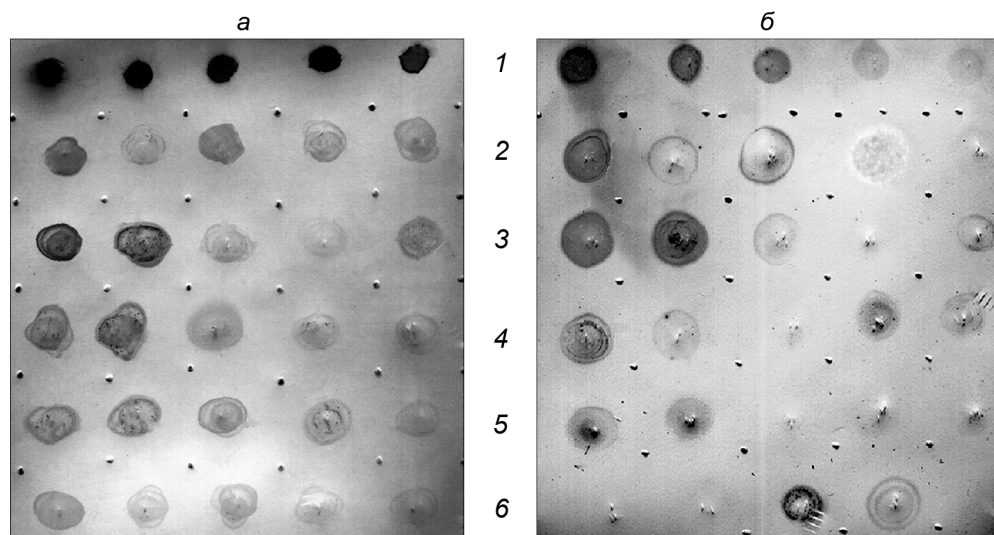


Рис. 2. Регистрация гексонного антигена в ОК и НГС с помощью дот-метода.

а – ОК и НГС наносили на НЦМ без обработки; б – ОК и НГС перед нанесением обрабатывали 0,1% твином-20; 1-й ряд – ОК аденовируса в различных концентрациях: а – 100 мкг/мл, б – 10 мкг/мл, в – 1 мкг/мл, г – 100 нг/мл, д – 10 нг/мл; ряд 2 – б – НГС.

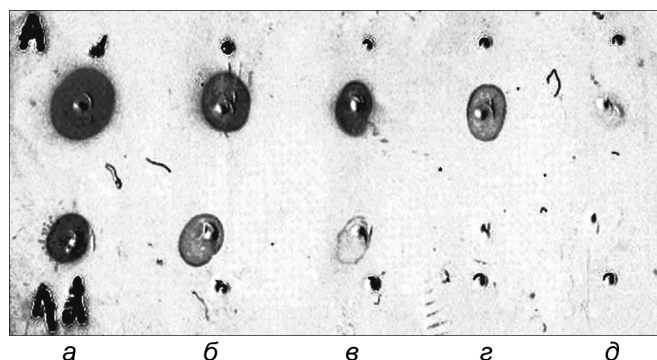


Рис. 3. Быстрый вариант дот-метода. Длительность анализа составляет (без процедуры окрашивания) 30 мин.

а – ОК вируса гриппа А в различных концентрациях (конъюгат 6D11-Пх); ad – ОК аденовируса типа 6 в различных концентрациях (конъюгат 6/1-Пх). Концентрации вирусов: а – 1 мкг/мл, б – 200 нг/мл, в – 50 нг/мл, г – 20 нг/мл, д – 10 нг/мл.

Методу ИФЛ свойственна быстрота и специфичность. Однако он тестирует вирусный антиген только в клетках, которые для успешного применения этого метода должны быть в достаточном количестве и целостности. Метод требует наличия соответствующего оборудования и опытного персонала.

Проведение АЗ-ИФА занимает много времени и требует использования специального оборудования для учета данных. Кроме того, если на подложке и в составе конъюгата используются МКА к различным вирусным белкам, в материалах от больных будут выявлены лишь комплексы этих белков. При использовании одного и того же варианта МКА в клиническом материале могут быть выявлены только вирусные белковые молекулы, содержащие не менее 4 копий соответствующих антигенных сайтов.

Предлагаемый для клинического использования дот-метод, несомненно, обладает рядом преимуществ. В отличие от ИФЛ и АЗ-ИФА он не нуждается в обязательном наличии целых клеток или комплексов вирусных белков, так как в предлагаемой модификации используется сорбция биологического образца непосредственно на НЦМ с последующим применением прямого антивирусного конъюгата. С помощью конъюгата могут быть выявлены не только гексоны в составе вирионов, но и внутриклеточный и внеклеточный свободный антиген.

Время, затрачиваемое на анализ дот-методом, в 2,5 раза меньше, чем в случае применения АЗ-ИФА. Метод не нуждается в оборудовании для учета данных, так как можно использовать визуальный способ оценки результата. При необходимости результаты регистрируют количественно с помощью денситометра или сканера.

В работе используется прямой конъюгат вирусспецифических МКА с пероксидазой хрена. Преимущество использования прямого конъюгата в качестве зонда по сравнению с многоступенчатой системой состоит в уменьшении неспецифического связывания с образцами, что делает метод более простым и сокращает время анализа.

В предложенном варианте дот-метода использован конъюгат, который был дополнительно очищен от свободной пероксидазы. Удаление из реакционной смеси несвязанных молекул пероксидазы приводит к снижению фонового окрашивания и как следствие к повышению чувствительности метода.

В исследовании использован пероксидазный конъюгат МКА из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» МКА 6/1, направленных к группспецифическому гексонному антигену аденовируса. Этот конъюгат проявил свойства перспективного

диагностического зонда, позволяющего определять присутствие вирусных антигенов в клиническом материале.

Отдельно необходимо остановиться на невозможности применения конъюгата 6/1-Пх при предварительной обработке НГС высокими концентрациями твина-20. Это может быть связано с тем, что детерминанта, к которой направлены МКА 6/1, организована нековалентными связями. Под воздействием высоких концентраций детергента эти связи разрушаются.

Представленные данные свидетельствуют о перспективности одноступенчатого варианта дот-метода для диагностики вирусных инфекций в клинических условиях. Прямой конъюгат на основе МКА 6/1 является эффективным и высокоспецифичным зондом, позволяющим регистрировать антиген аденовируса в клиническом материале от больных. Предложенная нами модификация дот-метода может быть рекомендована к использованию в лабораторной диагностике для выявления антигена аденовируса.

В настоящее время особую актуальность приобрели быстрые тесты у постели больного. В связи с этим нами начата работа по сокращению времени, необходимого для анализа дот-методом. Основные направления этого процесса обозначены в данной работе.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5, 8–9 см. REFERENCES)

- Иванова И.А., Мерингова Л.Ф., Дубровина Т.Я., Поляк Р.Я. Выявление вирусных антигенов в легких и селезенке мышей инфицированных вирусом гриппа. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1989; 5: 39–45.
- Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. М.: Мир; 1988.
- Амосова И.В. *Разработка и усовершенствование средств и методов иммунодиагностики аденовирусной инфекции*. Дисс. ... канд. биол. наук. СПб.; 2009.
- Иванова И.А. *Персистенция белков вируса гриппа А – характерная черта экспериментальной инфекции*. Дисс. ... канд. биол. наук. СПб.; 1994.
- Нго Т., Ленхофф Г., ред. *Иммуноферментный анализ*. М.: Мир; 1988.

Поступила 27.05.15

#### REFERENCES

- Ivanova I.A., Meringova L.F., Dubrovina T.Ya., Polyak R.Ya. Pole Detection of viral antigens in the lungs and spleen of mice infected with influenza virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 1989; 5: 39–45. (in Russian)
- Dubrovina T.Ya., Shidlovskaya N.V., Ivanova I.A., Poljak R.Ya. Significance of long lasting persistence of influenza virus antigen at the portal of infection and in the spleen of mice. *Acta virol*. 1992; 36 (5): 450–8.
- Meykhi B., ed. *Virology. Methods [Virusologiya. Metody]*. Moscow: Mir; 1988. (in Russian)
- Amosova I.V. *Development and Improvement of Means and Methods of Immunodiagnosis of Adenovirus Infection*. Diss. St.Petersburg; 2009. (in Russian)
- Galfre G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: Langone J.J., van Vunakis H., eds. *Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques*. Vol. 73, Part B. New York: Academic Press; 1981.
- Ivanova I.A. *Persistence of Influenza A virus Proteins – a Characteristic Feature of the Experimental Infection*. Diss. St. Petersburg; 1994. (in Russian)
- Ngo T., Lenkhoff G., eds. *Immunosorbent Assay [Immunofermentnyy analiz]*. Moscow: Mir; 1988. (in Russian)
- Ferris N.P., Nordengrahn A., Hutchings H., Reid S.M., King D.P., Ebert K. et al. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J. Virol. Methods*. 2009; 155 (1): 10–7.
- Koskinen J.O., Vainionpää R., Meltola N.J., Soukka J., Hänninen P.E., Soini A.E. Rapid method for detection of influenza A and B virus antigens by use of a two-photon excitation assay technique and dry-chemistry reagents. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45 (11): 3581–8.

Received 27.05.15