

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шпилевая М. В.¹, Рунина А. В.¹, Филиппова М.А.², Кубанов А. А.¹

СРАВНЕНИЕ ИММУНОЧИПОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА, ВЫПОЛНЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ СОПОЛИМЕРИЗАЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ И МЕТОДОМ БЕСКОНТАКТНОЙ ПЕЧАТИ

¹ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, 107076, Москва, Россия;

²ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, Россия

Цель работы – исследовать характеристики иммуночипов, изготовленных по технологии сополимеризационной иммобилизации и методом бесконтактной печати, для расширения возможностей диагностики сифилиса. На примере решения ряда диагностических задач показано, что оба вида иммуночипов позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью проводить скрининг на сифилис и обеспечивают возможность вероятностной дифференциацией разных форм данного заболевания. В статье описаны преимущества и недостатки метода бесконтактной печати, результаты проведенного анализа и проблемы, которые предстоит решить для повышения точности исследований с применением данной методики.

Ключевые слова: иммуночип; микрочип; серологические тесты; рекомбинантные антигены; *T. pallidum*.

Для цитирования: Шпилевая М.В., Рунина А.В., Филиппова М.А., Кубанов А.А. Сравнение иммуночипов для диагностики сифилиса, выполненных по технологии сополимеризационной иммобилизации и методом бесконтактной печати. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65 (1): 16-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-16-23>
Shpilevaya M.V.¹, Runina A.V.¹, Filippova M.A.², Kubanov A.A.¹

COMPARISON OF IMMUNOARRAYS FOR SYPHILIS DIAGNOSTICS PRODUCED BY CO-POLYMERIZATION IMMOBILIZATION AND NON-CONTACT PRINTING TECHNIQUES

¹State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology 107076, Moscow, Russia;

²The V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, 119991, Moscow, Russia

The aim of the study was to investigate the characteristics of immunoarrays (microarrays) produced by co-polymerization immobilization and non-contact printing techniques for enhancing the capacities of syphilis diagnostics. In diagnostic context immunoarrays of both protein immobilization techniques have shown high sensitivity and specificity together with potency to differentiate syphilis stages in serologic assays. The article discloses the advantages and limitations of non-contact printing techniques as well as the results and problems revealed in the study. Solution of these problems in future may provide the development of new serodiagnostic tools with higher accuracy of the results.

Key words: immunoarray; microarray; serological test; recombinant antigens; *T. pallidum*.

For citation: Shpilevaya M.V., Runina A.V., Filippova M.A., Kubanov A.A. Comparison of immunoarrays for syphilis diagnostics produced by co-polymerization immobilization and non-contact printing techniques. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65 (1): 16-23 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-16-23>

For correspondence: Shpilevaya M.V., Ph.D., senior researcher; e-mail: Aniram1970@list.ru

Information about authors:

Shpilevaya M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9957-4009>

Runina A.V., <http://orcid.org/0000-0003-3177-2823>

Filippova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9454-5938>

Kubanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>

Acknowledgment. The study was financed by the State Assignment № 056-00138-19-00 of Ministry of Health of Russian Federation for State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology in 2019. We thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences (Agreement №075-15-2019-1660 with the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation).

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

Received 11.11.2019
Accepted 19.11.2019

Введение. Одним из основных направлений современной медицины является мультиплексная диагностика, которая предполагает одновременное определение множества различных аналитов в одном образце. При разработке систем для комплексного выявления маркеров инфекционных заболеваний перспективным подходом представляется использование технологии микрочипов (биочипов).

Главным элементом микрочипа является матрица микрочаечек- эррей (см. рисунок). Функциональная единица эррея – спот – содержит уникальный индивидуальный зонд, специфичный к конкретной биологической молекуле или её фрагменту. Зондами могут служить фрагменты геномной ДНК или РНК, белки, олигосахариды и др. Объём капли для формирования спота измеряется пиколитрами [1], а его диаметр составляет 50 - 300 мкм. Споты располагаются упорядоченными рядами. Количество эрреев на микрочипе и количество спотов в пределах эррея зависят от задач исследования и могут варьироваться.

В зависимости от вида материала, сорбированного на подложке, микрочипы разделяют на ДНК-чипы [2], белковые чипы [3, 4], а также клеточные [5] и тканевые [6] микрочипы. Матрицы, где в качестве зондов иммобилизованы белковые молекулы, называются «белковыми чипами» или «иммуночипами». Для регистрации результатов анализа на белковых чипах используют вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками [7-9]. Учёт результатов основан на детекции флуоресценции метки вторичных антител, связавшихся с определёнными белковыми молекулами в эррее в процессе гибридизации. В качестве флуорофоров наиболее часто используются цианины Су3 (длина волны возбуждения 554 нм, длина волны эмиссии 568 нм) и Су5 (длина волны возбуждения 635 нм, длина волны эмиссии 670 нм). Детекция флуоресцентных сигналов в спотах иммуночипов осуществляется на специальном оборудовании – чип-ридерах. Современные чип-ридеры включают в себя несколько лазеров и фильтров, позволяющих регистрировать флуоресцентные сигналы различных флуорофоров, после чего полученная информация обрабатывается и переводится в цифровые значения соответствующих компьютерными программами.

Публикации, в которых в качестве инструмента научного исследования упоминаются микрочипы, появились в конце 1990-х годов [2,3,7,10]. К настоящему времени опубликовано большое число работ, посвящённых разным методам изготовления и применения белковых микрочипов [11-18]. В России разработана и применяется технология гидрогелевых иммуно- и ДНК-биочипов [19]. Тем не менее, продолжают работу по изготовлению белковых чипов на основе других технологий [20, 21], что свидетельствует о заинтересованности исследователей в развитии данного диагностического инструмента. Широкие возможности в этом направлении представляет технология бесконтактной печати.

В рамках государственного задания в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России выполняется проект по созданию белковой мультиплексной платформы

для диагностики сифилиса [22-29]. В рамках данного проекта были разработаны 2 вида иммуночипов, созданных с использованием двух технологий: сополимеризационной иммобилизации и бесконтактной печати. Оба вида иммуночипов предназначены для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью отдельной идентификации антител классов IgG и IgM к расширенной панели антигенов *T. pallidum* в биологическом материале (сыворотке крови) в реакции непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ). Разработка многопараметрической системы для диагностики сифилиса на основе иммуночипа позволит с высокой специфичностью и чувствительностью проводить скрининг на сифилис и обеспечит новые аналитические возможности, связанные с вероятностной дифференциацией разных форм данного заболевания и контролем эффективности его лечения.

Целью исследования явилось сравнение диагностических и технологических характеристик иммуночипов, изготовленных с использованием двух технологий – сополимеризационной иммобилизации и бесконтактной печати.

Материал и методы. Микрочипы (иммуночипы), созданные по технологии сополимеризационной иммобилизации, были изготовлены в рамках сотрудничества с ООО «Биочип-ИМБ» на базе Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. Принципиальным отличием данной технологии является размещение зондов не на плоской поверхности подложки, а в элементах гидрогеля полусферической формы [14]. Растворы зондов, смешанные с гелеобразующими мономерами, наносились на активированную поверхность стеклянной подложки с помощью

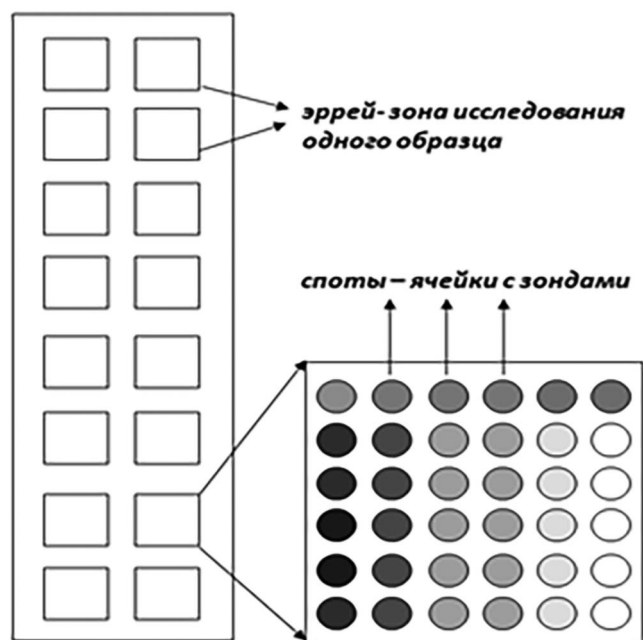


Схема микрочипа. Стрелками обозначены эрреи и отдельные споты.

игольчатых растров (пинов) механического робота. Под действием ультрафиолетового излучения происходила совместная полимеризация молекулярных зондов с основными компонентами геля. В результате этой реакции иммобилизуемые молекулы ковалентно присоединялись к мономерам растущей полимерной цепи и равномерно распределялись во всем объеме каждой гидрогелевой ячейки. Контроль качества нанесения осуществлялся с помощью специализированной оптики и компьютерного анализа изображения. Эррей иммуночипа покрывали реакционной камерой, в которой происходило взаимодействие иммобилизованных зондов с комплементарными белками. Один иммуночип может быть использован для анализа одного образца сыворотки крови.

Иммуночипы, созданные по технологии бесконтактной печати, изготовлены в ГНЦДК с использованием споттера *Sciflexarrayer S1 (Scenion, Германия)*. Основная рабочая часть споттера - диспенсер с пьезоэлектрическим дозатором, который наносит на поверхность слайда капли зондов объемом 300-360 пиколитров. Белки наносились на поверхность стеклянных слайдов *Nexterion (Schott, США)* с гидрогелевыми покрытиями, которое сохраняет трёхмерную структуру сорбированного белка, поддерживая его стабильность и функциональность. Для проведения диагностического исследования иммуночип помещали в специальную рамку с трафаретом, разделяющим 16 реакционных камер. Таким образом, на иммуночипе, выполненном методом бесконтактной печати, можно анализировать одновременно 16 образцов сыворотки крови.

Расширенная панель диагностических антигенов, иммобилизованных на иммуночипах, включала 10 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*: 4 коммерчески доступных антигена (Tr15, Tr17, TmpA, Tr47), традиционно применяемые для трепонема-специфической диагностики сифилиса, и 6 антигенов (Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038), синтезированных *de novo* в ГНЦДК. Рекомбинантные белки Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 депонированы в Биоресурсном центре «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика (регистрационные номера 13267, 13268, 13266, 13458, 13457 и 13459, соответственно). Схема эррея с 10 антигенами в четырёх повторах каждый, а также контрольными ячейками и ячейками, маркирующими границы эррея [26], была использована в экспериментах по сравнению диагностических характеристик иммуночипов, изготовленных с применением двух технологий. В экспериментах по изучению динамики профиля иммуноглобулинов двух классов у больных разными формами сифилиса и по исследованию возможности дифференциации форм сифилиса к десяти описанным антигенам были добавлены ещё два коммерческих рекомбинантных белка Tr0163 и Tr0971,

также в четырёх повторах каждый, то есть, эррей содержал 12 рекомбинантных антигенов [29].

Исследование на иммуночипах двух видов проводилось по единой методике. В каждый эррей вносили образец сыворотки крови в разведении 1:10 в 1-кратном фосфатно-солевом буфере (1xPBS) с 0,05% Tween 20. После инкубации и отмывки несвязавшегося материала в 1xPBS с 0,05% Tween 20 вносили вторичные антитела к иммуноглобулину IgG человека, меченые Cy5 и антитела к иммуноглобулину IgM человека, меченые Cy3, после чего иммуночипы ополаскивали деионизированной водой, высушивали в потоке воздуха и сканировали с помощью чип-ридера. Данные сканирования каждого эррея интерпретировались в цифровом формате в программе, поставляемой в комплекте с чип-ридером.

Для исследования были использованы образцы сыворотки крови больных различными формами сифилиса, диагноз которым установлен в соответствии с клиническими рекомендациями Российского общества дерматовенерологов и косметологов¹, а также образцы сыворотки крови здоровых индивидов.

Результаты и обсуждение. Нанесение рекомбинантных белков на поверхность матрицы методом бесконтактной печати выявило ряд особенностей данного подхода. Возникли технические сложности, связанные с иммобилизацией на поверхность иммуночипа двух рекомбинантных белков Tr0684 и Tr0965, печать которых так и не удалось осуществить. Использование для приготовления белковых растворов как 150 mM фосфатного буфера pH 8,5 (рекомендованного производителем споттера), так и фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7,4 приводило к стеканию аспирированного материала с кончика диспенсера (капилляра) и автоматическому прерыванию процесса печати. По этой причине на иммуночипе, созданном по технологии бесконтактной печати, данные антигены отсутствуют. Кроме того, выявлена нестабильность печати белка Tr0453, которая выражалась в пропуске капель (т.е. варьировании размера и количества спотов) и разбрызгивании материала с попаданием в соседние споты. Эрреи, содержащие описанные артефакты, выбраковывались в процессе контроля качества печати. Приведённые недостатки свойственны для бесконтактной печати на данном этапе разработанности методики. По данным литературы, ряд белков при необходимой для печати концентрации могут обладать высокой вязкостью, низким поверхностным натяжением, высокой ионной силой, что делает невозможным процесс их нанесения на поверхность слайда [30-32]. Для улучшения качества печати белковых растворов выпускаются пьезоэлектрические капилляры с модифицированной внутренней поверхностью [33].

В случае печати с использованием технологии сополимеризационной иммобилизации подобных проблем не описано.

Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М. : Деловой экспресс; 2016: 679-720.

Диагностические характеристики иммуночипов, изготовленных по двум технологиям, определялись тестированием образцов сыворотки крови больных различными формами сифилиса. В качестве контроля были использованы образцы сыворотки крови здоровых индивидов. Данные иммунореактивности образцов сыворотки с рекомбинантными антигенами *T. pallidum* в нРИФ на иммуночипах обоих видов послужили основанием для расчёта индивидуальной чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной предсказательной ценности, а также диагностической эффективности каждого использованного антигена. Диагностические характеристики рекомбинантных антигенов иммуночипа, выполненного по технологии сополимеризации, описаны ранее [26]. В табл. 1 приведены аналогичные параметры рекомбинантных белков *T. pallidum*, нанесённых методом бесконтактной печати. Антигены Тр0684 и Тр0965 в связи с описанными сложностями их иммобилизации на данной панели отсутствуют. Результаты исследований свидетельствуют о более низких диагностических характеристиках антигенов, нанесённых на иммуночип методом бесконтактной печати.

Интегральная оценка результатов исследования на иммуночипе с использованием формального критерия: положительной реакции сыворотки крови с 2 или более антигенами *T. pallidum* [12], при 100% специфичности позволила охарактеризовать как положительные 52 из 58 протестированных образцов сыворотки крови (90%). При этом учёт реакций с 4 традиционными им-

мунодоминантными антигенами охарактеризовал как положительные 40 образцов сыворотки крови (69%). Полученные результаты практически не уступают данным, полученным на иммуночипе, изготовленном по технологии сополимеризации [26]. Таким образом, использование двух описанных панелей антигенов повышает чувствительность скрининга до 90-91% с сохранением 100% специфичности.

Следующий этап работы включал использование иммуночипов с расширенной панелью из 12 антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM у больных разными формами сифилиса. Исследованы образцы сыворотки крови, полученные до начала лечения и через 12 месяцев, в течение которых была проведена антимикробная терапия больных сифилисом. Результаты сравнивали с данными стандартных серологических тестов: нетрепонемного (RPR) и трепонемных (ИФА, РПГА), выполненных с теми же образцами сыворотки. Установлено, что полученные с использованием иммуночипа результаты подтверждают данные стандартных серологических тестов [29]. Показано, что технология иммуночипа даёт перспективу расширения диагностических возможностей стандартных серологических тестов при контроле качества проводимого лечения.

Контроль эффективности лечения базируется в первую очередь на изучении динамики иммуноглобулинов класса IgM, однако, на слайдах *Nexterion* (Schott, США), которые были использованы для иммобилизации рекомбинантных антигенов методом

Таблица 1

Диагностические параметры рекомбинантных белков *T. pallidum*, использованных в качестве антигенов для диагностики сифилиса в формате иммуночипа, изготовленного методом бесконтактной печати

Диагностические характеристики	Тр15*	Тр17*	Тр47*	ТрpA*	Тр0453	Тр0319	Тр1038	Тр0277
Специфичность (%)								
Общая (n=58)	88,9	88,9	88,9	94,4	88,9	94,4	94,4	94,4
Чувствительность (%)								
Общая (n=58)	50,3	72,6	64,0	79,2	36,8	55,3	41,2	26,2
Первичный сифилис (n=11)	18,0	73,0	55,0	36,0	18,0	55,0	36,0	18,0
Вторичный сифилис (n=16)	100,0	94,0	100,0	100,0	88,0	69,0	19,0	38,0
Ранний скрытый сифилис (n=14)	64,0	71,0	57,0	93,0	29,0	64,0	64,0	36,0
Поздний скрытый сифилис (n=17)	12,0	53,0	41,0	76,0	6,0	35,0	47,0	12,0
Положительная предсказательная ценность (%)								
Общая (n=58)	93,5	95,5	94,9	97,9	91,3	96,9	96,0	93,8
Отрицательная предсказательная ценность (%)								
Общая (n=58)	64,4	50,0	56,8	41,4	69,8	60,5	66,7	71,7
Диагностическая эффективность (%)								
Общая (n=58)	59,2	76,3	69,8	82,9	48,7	64,5	53,9	42,1

Примечание. * – антигены, используемые в регламентированных серологических исследованиях для диагностики сифилиса.

Таблица 2

Распределение анализируемых образцов сыворотки крови в соответствии с формами сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты исследования антител классов IgG и IgM к расширенной панели из 12 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, изготовленной по технологии сополимеризации

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием линейных уравнений дифференциального анализа				
	Эффективность дифференциации, %	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*
(1) Вторичный сифилис (n=19)	94,7	18	0	1	0
(2) Ранний скрытый сифилис (n=20)	80,0	1	16	3	0
(3) Поздний скрытый сифилис (n=19)	89,4	0	0	17	2
(4) Здоровые (n=27)	96,2	0	0	1	26
Всего (n=85)	90,5	19	16	22	28

Примечание. Здесь и табл.3 - обозначения *1-4 в колонках аналогичны обозначениям в строках.

Таблица 3

Распределение анализируемых образцов сыворотки крови в соответствии с формами сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты исследования антител классов IgG и IgM к расширенной панели из 10 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, изготовленной по технологии бесконтактной печати

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием линейных уравнений дифференциального анализа				
	Эффективность дифференциации, %	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*
(1) Вторичный сифилис (n=19)	87,5	14	1	0	1
(2) Ранний скрытый сифилис (n=20)	100,0	0	17	0	0
(3) Поздний скрытый сифилис (n=19)	83,3	1	1	15	1
(4) Здоровые (n=27)	100,0	0	0	0	21
Всего (n=85)	93,0	15	19	15	23

Таблица 4

Сравнительные характеристики иммуночипов, выполненных по технологии бесконтактной печати и технологии сополимеризационной иммобилизации

Параметры сравнения	Бесконтактная печать	Метод сополимеризации
Диагностические характеристики		
1 Чувствительность / Специфичность (%)	90/100	91/100
2 Фоновая реакция	Высокая при определении уровня антител класса IgM	Незначительная
Технологические и эксплуатационные характеристики		
1 Количество исследований на 1 слайде	16	1
2 Стабильность печати	Качество печати связано с подбором диспенсера. В противном случае нестабильная печать или невозможность печати определенных антигенов	Широкие возможности печати Полимеризация в геле стабилизирует наносимые анализы
3 Сроки и условия хранения напечатанного слайда	1 год при 4°C в вакуумной упаковке, исключающей высыхание гелевой подложки	1 год при 4°C в картонной коробке
4 Необходимое оборудование для проведения анализа	Рамка-держатель и рамка-трафарет для разделения эрреев должны приобретаться отдельно	Есть реакционная камера на каждом чипе
5 Сканирующая система	Чип-ридер общего типа, позволяющий считывать спектры 2 флуорофоров	Специализированное готовое оборудование с программным обеспечением
6 Программируемый анализ данных с выдачей результата	Обработка данных в программе <i>Excel</i>	Обработки данных в универсальном аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (УАПК)
7 Сертификация оборудования для клинических лабораторных исследований в РФ	нет	есть

бесконтактной печати, при определении уровня IgM в образцах сыворотки крови фиксировался высокий уровень неспецифического фонового сигнала, обусловленный конъюгатом козлиных антител к иммуноглобулину IgM человека, меченому флуоресцентным красителем Cy3 (KPL, США). Неспецифический фоновый сигнал не удалось снизить ни блокировкой буфером, рекомендованным фирмой Schott (100 мМ фосфатный буферный раствор с 25 мМ этаноламина и 0,01% Tween 20 pH 8.5), ни добавлением к раствору конъюгата бычьего сывороточного альбумина (до концентрации 1%), ни сокращением времени инкубирования с конъюгатом, ни использованием меньших концентраций конъюгата. В итоге низкое соотношение специфического сигнала к фоновому значению флуоресценции не позволило оценить изменение уровня IgM в образцах сыворотки крови больных сифилисом в процессе лечения.

На третьем этапе работы проведено исследование возможности дифференциации форм сифилиса с использованием иммуночипов, изготовленных по двум описанным технологиям. Для вероятностной дифференциации форм сифилиса на основе выявления иммуноглобулинов классов IgG и IgM в сыворотке крови больных использован метод линейного дискриминантного анализа, формирующий оптимальное множество признаков, по которым распределение групп внутри выборки осуществлялось бы наиболее верно. Применение алгоритма линейного дискриминантного анализа позволяет сформировать систему классификационных функций общего вида:

$$D = a_1(\Phi L_{Tp15}) + a_2(\Phi L_{Tp17}) + \dots + a_n(\Phi L_{TpN}) + b,$$

где: D – классификационное значение дискриминантной функции; ΦL_{Tp15} – ΦL_{TpN} – независимые переменные, соответствующие интенсивности флуоресценции (о. е.) в ячейке с определенным антигеном; a_1 – a_n – коэффициенты уравнения, характеризующие вклад каждой из независимых переменных в дискриминацию групп; b – поправочная константа.

Объектом исследования стали образцы сыворотки крови больных вторичным ($n=19$), ранним скрытым ($n=20$) и поздним скрытым сифилисом ($n=19$). Диагноз установлен лечащим врачом на основании клинических данных и результатов стандартных серологических тестов. В исследование включены также сыворотки крови здоровых индивидов ($n=27$). В соответствии с классификационным значением дискриминантной функции каждый образец сыворотки с присущим ему спектром антител был отнесен к одной из трёх групп, соответствующих определенной форме заболевания, и к группе здоровых индивидов (табл. 2, 3).

Полученные результаты показали, что применение панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для определения иммуноглобулинов двух классов к каждому из антигенов даёт возможность дифференцировать больных представленными формами сифилиса и здоровых индивидов вне зависимости от способа иммобилизации антигенов. Эффективность дифференциации отдельных форм сифилиса превышает 80%. Стоит отметить, что более высокие показатели эффективности дифференциации

демонстрирует иммуночип с бесконтактным нанесением рекомбинантных белков.

Таким образом, проведена сравнительная оценка иммуночипов, изготовленных с использованием двух разных технологий на примере решения трех диагностических задач. Кроме вышеописанных различий двух типов иммуночипов существуют особенности эксплуатационных характеристик, такие как сроки и условия хранения готовых чипов, наличие специального сертифицированного оборудования для детекции результатов иммунофлуоресцентной реакции и анализа полученных данных. В табл. 4 представлены преимущества и недостатки как иммуночипов, так и методов их изготовления.

Заключение. Исследования, проведенные на иммуночипах с применением двух технологий, свидетельствуют о целесообразности разработки мультиплексных платформ для лабораторной диагностики *T. pallidum*. Их использование для определения уровня антител классов IgG и IgM против расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* позволяет решать задачи более эффективного выявления сифилитической инфекции, расширения диагностических возможностей стандартных серологических тестов и вероятностной дифференциации отдельных форм сифилиса. На двух видах иммуночипов получены непротиворечивые результаты. Отмеченные недостатки метода бесконтактной печати связаны с этапом его становления, и выполненная работа обозначила проблемы, которые предстоит решить, чтобы данная технология давала надёжные результаты и обеспечила новые возможности для постановки диагноза и контроля качества лечения.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России № 056-00138-19-00 на 2019 год. Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Соглашение с Министерством науки и высшего образования № 075-15-2019-1660).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 6-10, 15, 21, 24, 30-33
см. REFERENCES)

1. Рубина А., Паньков С., Иванов С. и др. Белковые микрочипы. Доклады Академии наук. 2001; 5: 419-22.
2. Фесенко Д., Наседкина Т., Мирзабеков А. Бактериальный микрочип: принцип работы на примере обнаружения антибиотиков. Доклады Академии наук. 2001; 381 (6): 831-3.
3. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Дементьева Е.И., Савватеева Е.Н., Коновалова Е.В., Соколова З.А. и др. Тест- система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена в сыворотке крови. Российский биотерапевтический журнал. 2006; 5 (2): 49-57.
4. Смердова М.А., Маркелов М.Л., Гушин А.Е., Судьина А.Е. и др. Разработка экспериментальной тест-системы на основе иммуночипа для серодиагностики сифилиса. Журнал микробиологии. 2008; 6: 54-8.
5. Манзенок И.Н., Шипулин Г.А., Алексеева Ю.А. и др. Разработка иммуночипа для раздельной детекции антител к вирусу гепатита С. Клиническая лабораторная диагностика. 2008; 6: 25–30.

IMMUNOLOGY

6. Грядун Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М. Наседкина Т.В. Демет'ева Е.И., Рубина А.Ю. и др. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике. *Лаборатория*. 2009; 3: 10-4.
7. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Соколова З.А., Паклин Н.Б., Грабко В.И. Оценка диагностических характеристик коммерческой мультиплексной системы на основе суспензионных микрочипов для количественного анализа белковых опухолевых маркеров. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2011; 22: 58-64.
8. Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Карань Л.С., Ушакова М.А., Пудова Е.А., Ромашкина А.С. и др. Новые возможности в серологической диагностике иксодовых клещевых боррелиозов с использованием иммуночипа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 12: 51-5.
9. Ванг С., Фенг В. Прогресс в исследовании сайт-ориентированной и трёхмерной иммобилизации белков. *Молекулярная биология*. 2015; 49 (1): 3-25.
10. Грядун Д.А., Шаскольский Б.Л., Наседкина Т.В., Рубина А.Ю., Заседателев А.С. Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя. *Acta naturae*. 2018; 10 (4): 4-18.
11. Зиновьев С.В., Терентьев И.Г., Уткин О.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Савостикова М.В. Тест-система «Биочип-SER» для флюоресцентного иммуноцитохимического исследования экспрессии антигена Ер-SAM на материале выпотных жидкостей и смывов. *Современные технологии в медицине*. 2018; 10 (4): 34-41.
12. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В., Китаева Н.В., Ротанов С.В. и др. Способ диагностики сифилиса путем одновременного определения реагиновых и трепонемоспецифических антител к *T.pallidum* на микроскопных альдегидных слайдах Патент РФ № 2394496 С1; 2009.
13. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Фриго Н.В., Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В. Разработка биочипа для диагностики сифилиса путём одновременного определения антител к кардиолипину и специфическим антигенам *T. pallidum* (2012). Available at: <https://docplayer.ru/43921944-Razrabotka-biochipa-dlya-diagnostiki-sifilisa-putem-odnovernennogo-opredeleniya-antitel-k-kardiolipinu-i-spezificheskim-antigenam-t.html>
14. Рунина А.В., Затевалов А.М., Катунин Г.Л., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. Варьирование иммунного ответа на антигены Trp0277, Trp0684, Trp0965 и Trp1038 *Treponema pallidum* при различных формах сифилиса. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(1): 70-8.
15. Рунина А.В., Катунин Г.Л., Филиппова М.А. Затевалов А.М., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Иммуночип для серологической диагностики сифилиса с использованием расширенной панели рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 165 (6): 726-31.
16. Рунина А.В., Шпилева М.В., Дерябин Д.Г. Иммуночип с расширенной панелью рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для совершенствования серологической диагностики сифилиса. *Лабораторная служба*. 2018; 3(2):117.
17. Рунина А.В., Катунин Г.Л., Кубанов А.А. Дерябин Д.Г. Серологическая диагностика сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов, основанная на использовании иммуночипа с расширенной панелью антигенов *Treponema pallidum*. *Российский иммунологический журнал*. 2018;12 (4): 48-54.
18. Рунина А. В., Шпилева М. В., Филиппова М. А., Катунин Г.Л., Кубанов А.А. Применение иммуночипа с панелью из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM в сыворотке крови больных сифилисом до и после терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 546- 52.
3. Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A. et al. Protein microchips: Use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem*. 2000; 278: 123-31.
4. Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Ivanov S.M., Dement'eva E.I., Mirzabekov A.D. Protein microchips. *Doklady Akademii Nauk*. 2001; 5: 419-22. (in Russian)
5. Fesenko D., Nasedkina T., Mirzabekov A. Bacterial microchip: principle of operation using antibiotic detection as an example. *Doklady Akademii Nauk*. 2001; 381 (6): 831-3. (in Russian)
6. Huh D., Matthews BD., Mammoto A. et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*. 2010; 25 (328): 1662-8.
7. Eikins R. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clinical Chemistry*. 1998; 44: 2015-30.
8. Espina V., Woodhouse E.C., Wulfskuhle J. et al. Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J. Immunol. Meth*. 2004; 290: 121-33.
9. Nielsen U., Geierstanger B. Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J. Immunol. Meth*. 2004; 290: 107-20.
10. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics*. 1996; 14: 45760.
11. Ryabykh T.P., Osipova T.V., Dementieva E.I. et al. Biochip-based test-system for simultaneous quantitative determination of prostate-specific antigen (total and free forms) in blood serum. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2006; 5 (2): 49-57. (in Russian)
12. Smerdova M.A., Markelov M.L., Gushchin A.E., Sudyna A.E. et al. Development of experimental test-system on the basis of immunochip for syphilis serodiagnostics. *Zhurnal mikrobiologii*. 2008; 6: 54-8. (in Russian)
13. Chekanova T.A., Markelov M.L., Manzenyuk I.N., Shishova A. V., Alekseeva Yu.A. et al. Design of an immunochip for separate detection of hepatitis C virus antibodies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 6: 25-30. (in Russian)
14. Gryadunov D.A., Zimenkov D.V., Mihaylovich V.M. Nasedkina T.V. Dement'eva E.I., Rubina A.Yu. The technology of hydrogel biochips and its application in medical laboratory diagnostics. *Лаборатория*. 2009; 3: 10-4. (in Russian)
15. Sanchez-Carbayo M. Antibody array-based technologies for cancer protein profiling and functional proteomic analyses using serum and tissue specimens. *Tumour Biol*. 2010; 31(2): 103-12.
16. Ryabykh T.P., Osipova T.V., Sokolova Z.A., Paklin N.B., Grabko V.I. Assessment of diagnostic potentials of a commercial multiplex suspension microchip-based system for quantitative analysis of protein tumor markers. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN*. 2011; 22: 58-64. (in Russian)
17. Tchekanova T.A., Markelov M.L., Karan L.S., Ushakova M.A., Pudova E.A., Romashkina A.S. et al. The new possibilities in serologic diagnostic of ixodes mite-borne borreliosis using immunochip. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 12: 51-5. (in Russian)
18. Wang C., Feng B. Research progress on site-oriented and three dimensional immobilization of protein. *Moleculyarnaya Biologiya*. 2015; 49 (1): 3-25. (in Russian)
19. Gryadunov D.A., SHaskol'skij B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.YU., Zasedatelev A.S. The technology of hydrogel biochips ИМБ РАН: 30 years later. *Acta naturae*. 2018; 10 (4): 4-18. (in Russian)
20. Zinoviev S.V., Terentiev I.G., Utkin O.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Savostikova M.V. Biochip-SER test system for fluorescent immunocytochemical analysis of ep-cam antigen expression in effusions and washes. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2018; 10(4): 34-41. (in Russian)
21. Canonica G.W., Ansotegui I.J., Pawankar R. et al. A WAO — ARIA — GALEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013; 6 (1):17.
22. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Lesnaya I.N., Frigo N.V., Kitaeva N.V., Rotanov S.V. et al. A method for the diagnosis of syphilis by simultaneous determination of reagin and treponemosepecific antibodies to *T. pallidum* on microscopic aldehyde slides. Patent RF N 2394496 C1; 2009. (in Russian)

REFERENCES

1. Papen R. Nanoliter dispensing for Drug Discovery. Presented at the IBC Conference on Microfabrication and Microfluidic Technologies. San Diego; 1997; August: 7-8.
2. Khrapko K., Lysov Yu., Khorlin A. et al. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Letters*. 1989; 256: 118-22.

23. Kubanov A., Runina A., Deryabin D. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects. *Biomed Research International*. 2017; Article ID 1436080.
24. Runina A. V., Zatevalov A. M., Katunin G. L., Deryabin D.G., Kubanov A.A. Variation of immune response to tp0277, tp0684, tp0965 and tp1038 treponema pallidum antigens in different syphilis stages. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2017; 11(1): 70-8. (in Russian)
25. Runina A.V., Katunin G.L., Filippova M.A., Zatevalov A.M., Kubanov A.A., Deryabin D.G. Immunochip for serological diagnosis of syphilis using an extended panel of recombinant antigens *T. pallidum*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 165(6): 726-31. (in Russian)
26. Runina A., Shpilevaya M.V., Deryabin D. Immunochip with an extended panel of recombinant antigens *T. pallidum*. For to improve the serological diagnosis of syphilis. *Laboratornaya sluzhba*. 2018;3(2):117. (in Russian)
27. Runina A., Katunin G., Kubanov A., Deryabin D. Serological Diagnostics of Syphilis in HIV-positive Patients Using Immune-microarray with Expanded Panel of *Treponema Pallidum* Antigens. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2018;12(4): 48-54. (in Russian)
28. Runina A.V., Shpilevaya M.V., Filippova M.A., Katunin G.L., Kubanov A. A. Diagnostic immunoarray assay for characterization of immunoglobulin IgG and IgM level in syphilis patients serum towards 12 recombinant antigens of *T. pallidum* before and after the therapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(9): 546-52. (in Russian)
29. McWilliam I., Kwan M. C., Hall D. Inkjet Printing for the Production of Protein Microarrays *Methods in molecular biology*. 2011; 785: 345-61.
30. Wu P., Grainger D. W. Comparison of Hydroxylated Print Additives on Antibody Microarray Performance. *Journal of Proteome Research*. 2006; 5: 2956-65.
31. Gutmann O., Kuehlewein R., Reinbold S. et al. Fast and reliable protein microarray production by a new drop-in-drop technique. *Lab. Chip*. 2005; 5: 675-81.
32. Scidrop pico Scenion AG. Technical Information Piezo Dispense Capillary (PDC). Available at: <https://www.scenion.com/technology/scidrop-pico>.

Поступила 11.11.19
Принята к печати 19.11.19