

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.078.33-074:543.544]:615.47

Урусов А.Е.¹, Жердев А.В.¹, Старовойтова Т.А.², Венгеров Ю.Ю.¹, Дзантиев Б.Б.¹

ПРИБОРНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЭКСПРЕСС-ТЕСТОВ

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), 119071, г. Москва, Ленинский проспект, 33; ²Городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова, 117049, г. Москва, Ленинский проспект, 8

Преобладающей тенденцией в мировой практике является расширение сектора «быстрых тестов» – тест-систем, позволяющих проводить анализ при визите врача на дом или при первичном обследовании больного без каких-либо дополнительных приборов и реагентов. Эффективным методическим решением для внелабораторной диагностики является иммунохроматография, в настоящее время активно применяемая для контроля сотен диагностически значимых маркеров инфекционных заболеваний, метаболических и функциональных расстройств. Однако традиционная иммунохроматография ориентирована на качественную визуальную оценку результатов тестирования – заключение о наличии или отсутствии окрашивания определенных зон тест-полоски. Поэтому крайне востребованы методические решения, сохраняющие достоинства иммунохроматографии – экспрессность и методическую простоту, но при этом обеспечивающие объективность диагностики и повышающие ее информативность. В обзоре рассмотрены основные методические решения и тенденции их практической реализации, направленные на приборное документирование, обработку и интерпретацию результатов иммунохроматографического анализа. Представлены как оптические системы регистрации в видимой области спектра, доминирующие в ассортименте современных детекторов, так и новые решения, ориентированные на работу с флуоресцентными, магнитными и электропроводными маркерами. Охарактеризованы перспективы дальнейшего развития данного направления, включая использование в качестве детекторов бытовых коммуникационных устройств и формирование облачных баз данных для хранения и обработки информации о результатах обследований.

Ключевые слова: иммуноанализ; экспресс-тесты; иммунохроматография; портативные детекторы; оптическая детекция.

Для цитирования: Урусов А.Е., Жердев А.В., Старовойтова Т.А., Венгеров Ю.Ю., Дзантиев Б.Б. Приборная регистрация иммунохроматографических экспресс-тестов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 173-179. DOI 10.18821/0869-2084-2016-3-173-179.

Urusov A.E.¹, Jerdev A.V.¹, Starovoitova T.A.², Vengerov Yu.Yu.¹, Dzantiev B.B.¹

THE DEVICE REGISTRATION OF IMMUNE CHROMATOGRAPHIC EXPRESS-TESTS

¹The A.N. Bach institute of biochemistry, the federal research center "Fundamental basics of biotechnology" of the Russian academy of sciences (Federal research center of Biotechnology of RAS), 119071 Moscow, Russia; ²The N.I. Pirogov municipal clinical hospital №1, 117049 Moscow, Russia

The development of sector of "fast-testing" i.e. test-systems permitting carrying out analysis during home visit of doctor or at primary examination of patient without any additional devices and reagents is predominant tendency in international practice. The immunochromatography is an effective technical solution in out-laboratory diagnostic, which nowadays is actively applied in controlling hundreds of diagnostically significant markers of infectious diseases, metabolic and functional disorders. However, common immunochromatography is focused on qualitative visual evaluation of results of study i.e. conclusion on presence or absence of coloration of particular zones of test-band. Therefore, the technical solutions retaining such merits of immunochromatography as expressness and technical simplicity and at the same time providing objectivity of diagnostic and increasing its informativeness are extremely in demand. The review considers main methodical solutions and tendencies of their practical implementation targeted at device documentation, processing and interpretation of results of immunochromatography analysis. The optical systems of registration in visible area of spectrum dominating in assortment of modern detectors are presented. The new solutions oriented on working with fluorescent, magnetic and electroconductive markers are presented too. The perspectives of further development of this direction are characterized including application as detectors of domestic communication devices and formation of cloud data bases for storage and processing of information concerning results of examinations.

Key words: immune analysis; express-test; immunochromatography; portable detectors; optical detection

For citation: Urusov A.E., Jerdev A.V., Starovoitova T.A., Vengerov Yu.Yu., Dzantiev B.B. The device registration of immune chromatographic express-tests. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (3): 173-179. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-173-179.

For correspondence: Dzantiev B.B., doctor of chemical sciences, professor, deputy director. e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

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

Financing. The study carried out with support of the Russian scientific foundation (grant 14-16-00149)

Received 02.09.2015
Accepted 15.12.2015

Введение. Быстрая и достоверная диагностика заболевания обеспечивает своевременное начало лечения и обоснованный выбор эффективных терапевтических мероприятий. По оценке компании Roche Molecular Diagnostics, хотя расходы на диагностику *in vitro* составляют всего 2% от общих расходов на здравоохранение, на основании получаемых с ее помощью данных принимается 60% терапевтических решений (www.roche.com/about/business/diagnostics/about-diagnostics.htm).

В последние годы активно развивается диагностика «по месту обращения» – РОС («point-of-care»)-диагностика, включающая анализы, которые проводятся при первичном обследовании поступившего больного, массовых скрининговых тестированиях, визите врача на дом, самодиагностике. Только за период с 2008 по 2013 г. доля мирового рынка медико-аналитических систем, приходящаяся на средства РОС-диагностики, выросла в 3 раза [1]. Тест-системы для РОС-диагностики обеспечивают более дешевый и быстрый анализ по сравнению с методами, используемыми в стационарных лабораториях, и позволяют оперативно получить информацию, необходимую для дальнейших решений. Среди тест-систем РОС широко представлены тесты на основе иммунохроматографии (ИХ), производимые для широкого круга диагностически значимых объектов. Первые ИХ-тесты были предложены еще в начале 1980-х годов для домашней диагностики беременности [2] – наиболее известной и массовой области применения ИХ и на сегодняшний день. ИХ занимает важное место среди современных методов контроля психоактивных соединений, кардио- и онкомаркеров, аллергенов, микроорганизмов – возбудителей различных инфекционных заболеваний, серодиагностики – выявления в крови антител против тех или иных патогенов и т. д. [3–7]. Только в РФ более 500 ИХ-тест-систем зарубежных и отечественных производителей зарегистрированы как медико-диагностические средства (roszdravnadzor.ru).

ИХ хорошо адаптирована для внелабораторной диагностики. В классическом варианте все необходимые для анализа реагенты предварительно нанесены на мембраны, составляющие ИХ-тест-полоску. Контакт тест-полоски с тестируемой пробой приводит к движению жидкости вдоль мембран; при этом инициируются специфические взаимодействия иммунореагентов, результатом которых становится окрашивание определенных участков тест-полоски.

Традиционно ИХ-тесты рассматривались как средства качественного анализа, когда на основании визуально наблюдаемого окрашивания пользователь делает вывод о присутствии в пробе контролируемого соединения (или превышения им определенной пороговой концентрации). Хотя денситометры – средства количественной регистрации окрашивания твердых носителей – как приборы для научных и промышленных контрольных лабораторий известны давно, в традиционном исполнении они непригодны для РОС-анализов и рассматривались как избыточные для ИХ средства. Однако за последнее десятилетие появился ряд новых регистрирующих устройств, использование которых не приводит к существенному усложнению анализа или к большим дополнительным расходам.

Настоящий обзор посвящен рассмотрению современных средств регистрации результатов ИХ, уже доступных пользователям либо имеющих хорошие перспективы внедрения в практику в ближайшем будущем.

Оптическая регистрация: принцип и возможности. Общий принцип оптической регистрации результатов ИХ-анализа представлен на рис. 1. Основными элементами измерительного устройства являются источники освещения (1), система фокусировки (2) и устройство регистрации интенсивности (3) света, отраженного тестируемой поверхностью (4), и средства дальнейшей обработки результатов измерения (5).

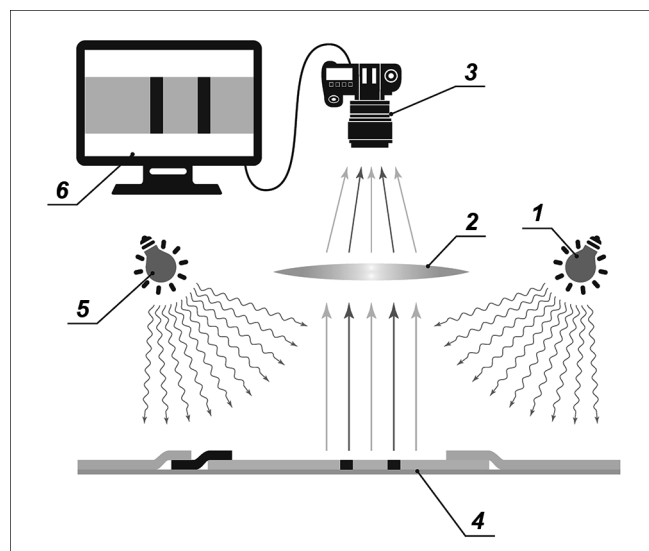


Рис. 1. Общий принцип оптической регистрации результатов ИХ-анализа.

Обозначения см. в тексте.

В 1990-е годы предпринимались попытки создания детекторов, регистрирующих суммарную интенсивность окрашивания (яркость отраженного света) на определенных участках тест-полоски с помощью системы светоиспускающих диодов и индивидуальных систем трансформации сигнала. Поскольку значимым результатом ИХ является окрашивание строго определенной зоны тест-полоски, необходима ее довольно точная локализация. В связи с этим детекторы были весьма громоздки. Так, J. Blatt и соавт. предложили устройство из 28 светочувствительных датчиков, располагающихся вдоль тест-полоски [8]. Данный подход остался не востребован практикой, хотя на уровне лабораторных образцов появляются новые конструкции таких устройств, совмещающие компактность с высокой чувствительностью и воспроизводимостью детекции [9].

Доминирующим средством детекции результатов ИХ, позволяющим легко и быстро получать полноцветное изображение тест-полоски, стали портативные цифровые камеры [10, 11], что обусловлено бурным развитием их технологии в начале 2000-х годов как устройств массового применения и соответствующим снижением стоимости. Серийно производимые камеры регистрируют изображения с разрешением до 2400 dpi, что соответствует размеру индивидуально характеризуемого участка менее 1 мкм². Использование в детекторе источников света с заданными спектральными характеристиками (часто монохроматических) обеспечивает высокий контраст между фоновым и специфическим окрашиванием.

В любом цифровом оптическом детекторе изображение тест-полоски представляется как данные о массиве точек, расположенных в виде горизонтальных и вертикальных рядов. Каждая такая точка, пиксель, характеризуется тремя численными параметрами, соответствующими трем каналам формирования изображения – красному (Red), зеленому (Green) и синему (Blue) – схема RGB. Результат регистрации по каждому из каналов – целое число, увеличивающееся с ростом интенсивности окрашивания. Для обычных детекторов эта величина варьирует от 0 до 255. Данные трех каналов могут быть усреднены и представлены как характеристики черно-белого изображения. Однако использование отдельных цветных каналов обеспечивает дополнительные воз-

возможности при обработке результатов ИХ-анализа. Так, С. Gui и соавт. [12] показали, что при работе с данными R-канала отношение специфического и неспецифического сигналов возрастает более чем в 3 раза по сравнению с оценкой суммарного (полноцветного) изображения; благодаря этому авторы снизили предел ИХ-обнаружения антигенов *Helicobacter pylori* до 20 пг/мл.

Какие же средства (способы) регистрации изображения тест-полоски и характеристики результатов ИХ доступны пользователю на сегодняшний день?

Оптическая цифровая регистрация результатов иммунохроматографии

Специализированные оптические детекторы. Специализированные системы регистрации результатов ИХ-измерений выпускаются рядом производителей (табл. 1). Почти все они позволяют проводить измерения в автоматическом режиме. Благодаря этому возрастает производительность измерений и их объективность (оператор не участвует в принятии решения по оценке полученного результата). Большинство изготовителей детекторов поставляют и тест-полоски, адаптированные для работы с данным детектором. Такие широкие панели тест-систем предлагают, например, фирмы Merck

Millipore и Neogen Corporation. Данная комплектность очень важна для корректного анализа. Измеряя интенсивность окрашивания для произвольной выборки тестов, производимых для качественного анализа, мы можем столкнуться с такой ситуацией, когда режимы изготовления разных тестов несколько различаются (например, в силу особенностей разных технологических линий), что не препятствует получению качественных («да-нет») результатов тестирования, но искажает оценку содержания контролируемого аналита.

Однако «закрытость» большей части коммерческих детекторов – их использование только в сочетании с тест-системами того же производителя (см. табл. 1) – существенно ограничивает возможности массового применения. Измерения других видов тест-систем искусственно ограничиваются производителями, для чего применяются штрих-коды, иные оптические или магнитные метки, наносимые на тест-полоску. В этом отношении существенно больший интерес представляют «открытые» детекторы, позволяющие получать изображения тестов любого производителя с оценкой интенсивности окрашивания и документированием результатов [13, 14].

В последние годы на рынке появились сверхпортативные аппаратно-программные комплексы для анализа результатов

Таблица 1

Основные производители и модели приборов для оптической регистрации результатов ИХ (по [45], с дополнениями)

Компания	Страна	Сайт	Модель прибора	Пригодность для фотометрии/флуориметрии	Возможность работы с тестами других производителей
Bio-AMD	Англия	bioamd.com	Digital Strip Reader	+/-	-
Charm Scientific	США	charm.com	Charm EZ	+/-	-
Concateno	Англия	concateno.com	Alere™ DDS®2 Mobile Test System	+/-	-
DCN (Diagnostic Consulting Network)	США	dcndx.com	ESE-Quant: Handheld Lateral Flow Reader	+/-	+
			ESE-Quant: Benchtop Lateral Flow Reader	+/+	+
			Fluo Visualizer. Handheld Qualitative Lateral Flow Reader	+/+	+
Hamamatsu	Япония	hamamatsu.com	C10066–10 Immunochromato-Reader	+/-	+
Maxwell Sensors	США	maxwellsensors.com	FS-Scanner	+/+	+
Roche	Швейцария	www.roche.com	cobas-h232	+/-	-
Megalab	Греция	megalab.gr	Easy Reader	+/-	-
Merck Millipore (Merck KGaA)	Германия	merckmillipore.com	RQflex®	+/-	-
Neogen Corporation	США	neogen.com	AccuScan PRO	+/-	-
Opticon	Германия	opticon.de	opTrilyzer	+/-	-
Reagena	Финляндия	reagena.fi	ReaScan	+/-	-
Response Biomedical Corp.	Канада	responsebio.com	RAMP®READER	+/+	-
Romer Labs	Австрия	romerlabs.com	AgraVision™	+/-	-
Skannex AS	Норвегия	skannex.com	SkanMulti; SkanFlexi	+/-	+
Shanghai Kinbio Tech	Китай	kinbio.com	Kinbio DL2032	+/-	+
Shenzhen Highcreation Technology	Китай	hkrgr.com	Reader HR201	+/-	+
Ushio	Япония	ushio.co.jp	Point Reader	+/-	-
Vedalab	Франция	vedalab.com	Easy Reader	+/-	-
Синтэко-Комплекс	Россия	microanaliz.ru	Рефлеком	+/+	+

Таблица 2

Приборы для магнитной регистрации результатов ИХ

Компания	Страна	Сайт	Модель прибора	Возможность работы с тестами других производителей
Magna BioSciences	США	magnabioscience.com	MICT® Bench-Top System	Да
Magnasense Technologies	Финляндия	magnasense.com	Magnasense's Magnetometric Reader	Да
VWR International	США	vwr.com	FoodChek™'s MICT System	Нет

ИХ. В качестве примеров можно упомянуть продукцию немецкой компании Bioamd (bioamd.com) – Digital Strip Reader – и разработку китайской компании Sugentech (sugentech.com) – кассету тест-полоски со встроенным детектором и дисплеем.

Разнообразие приборных решений соответствует и широкому ассортименту программ, поставляемых как в комплекте с оборудованием, так и отдельно.

Приборная оптическая регистрация позволяет применять в ИХ-тестах флуоресцентные маркеры (органические низкомолекулярные соединения, квантовые точки, окрашенные латексные частицы) с эмиссией как в видимой [15, 16], так и в инфракрасной спектральной области [17, 18]. При работе с такими тестами можно наращивать аналитический сигнал, варьируя интенсивность возбуждающего света, а также уменьшить уровень фонового свечения, подобрав длину волны возбуждающего света и оптические свойства маркера. В ряде случаев показан существенный выигрыш в пределе обнаружения ИХ-тест-систем при переходе от колориметрических маркеров – к флуоресцентным, например, в 10 раз при детекции хлорамфеникола [19, 20] и диагностике сифилиса [21], в 5 раз – при детекции бенз(а)пирена [22].

Использование неспециализированных устройств. Регистрацию результатов ИХ могут осуществлять не только специализированные детекторы, но и обычные мобильные устройства и офисная техника [23]. Описаны примеры успешного применения для этих целей камер мобильных телефонов и смартфонов [24–27], в том числе и при работе с флуоресцентными метками [28]. Такие детекторы удобны и просты в использовании, не зависят от электропитания и коммуникаций, позволяют провести анализ даже в полевых условиях. Выбор таких, уже имеющихся у пользователя, приборов исключает необходимость покупки специализированных устройств.

Установленная на прибор программа обеспечивает обработку регистрируемых изображений и получение численных результатов анализа. В качестве примера такой разработки можно указать специализированное программное обеспечение для смартфонов и планшетов на базе Android, iOS и Windows, разработанное и предлагаемое компанией Novarum™ Readers (Великобритания, novarumreader.com).

Отметим, однако, что при работе с изображениями тест-полосок, заснятыми обычным образом, воспроизводимость получаемых результатов часто оказывается невысокой. Причина такой ситуации – невозможность унифицировать взаимное позиционирование камеры и тестов, обеспечивать стабильное и равномерное освещение. Фиксация положения тест-полоски и унификация ее освещения – технически сложная задача, но ее решение требует индивидуального адаптера под каждую из многочисленных моделей сотовых телефонов [29].

Альтернативный подход к получению цифрового изображения тест-полоски состоит в использовании стандартных сканеров. При этом обычная процедура сканирования дает изображение тест-полоски с высоким разрешением, обработка которого может быть произведена с использованием уже существующих программ, т. е. не требует специальных решений для ИХ. Данная ситуация обусловлена тем, что анализ цифрового изображения тест-полоски принципиально не отличается от обработки результатов электрофореза, уже реализованной в существующих программах средствах.

Из доступного пользователю разнообразия можно рекомендовать программу Total Lab Quant (TotalLab, Великобритания, totallab.com), которая обеспечивает автоматизированный

анализ изображений и характеризуется простотой использования (рис. 2). Сходными возможностями обладает программа МАПА Diagnostics (МАПА АВ, Швеция, maiadiagnostics.com), позволяющая работать с 16-битным – от 0 до 65 535 – диапазоном значений интенсивности (оттенков серого) и за 5–10 мин получать данные для 200–300 тест-полосок. Самая компактная программа для анализа изображений – Gel Analyzer 2010a (gelanalyzer.com); при размере всего в 250 килобайт она способна проводить все необходимые измерения ИХ-тест-полосок.

Определение концентрации аналита. Для перехода от измеренной интенсивности окрашивания аналитической зоны к концентрации аналита необходимо воспользоваться соответствующей градуировочной зависимостью. Как правило, для этих расчетов не требуются дополнительные усилия оператора: градуировочная кривая хранится в памяти устройства и программное обеспечение детектора позволяет автоматически вычислить искомую величину. Однако для определения параметров градуировочной кривой могут потребоваться предварительные измерения, проведенные для стандартных образцов с известными концентрациями аналита (необходи-

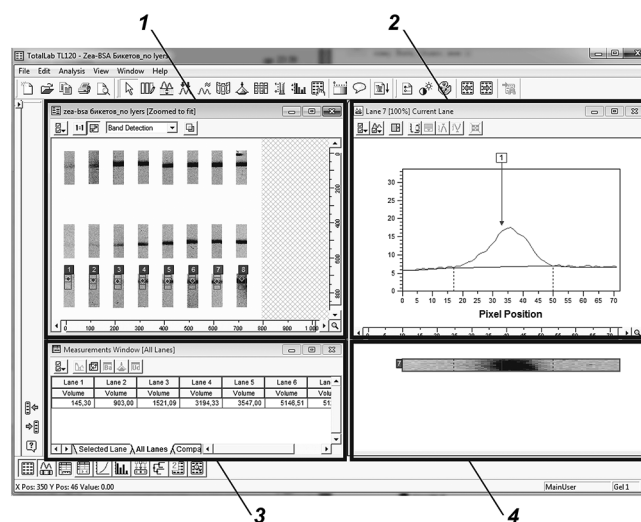


Рис. 2. Рабочее окно программы Total Lab Quant и ее использование для характеристики результатов ИХ.

1 – внешний вид массива тест-полосок; 2 – распределение интенсивности окрашивания вдоль анализируемой тест-полоски; 3 – данные идентификации зоны связывания и оценки интенсивности ее окрашивания; 4 – увеличенное изображение анализируемой тест-полоски.

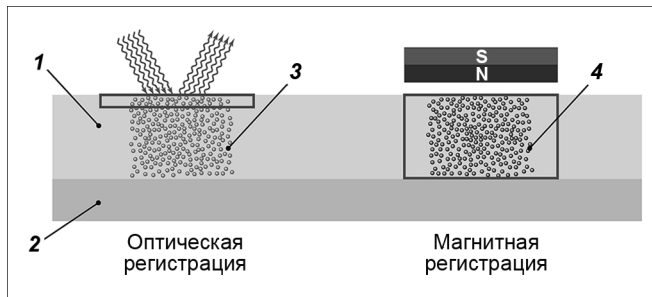


Рис. 3. Сравнение оптической и магнитной детекции результатов ИХ.

1 – рабочая мембрана; 2 – пластиковая подложка; 3 – коллоидное золото или латексные частицы; 4 – магнитные частицы. Прямоугольниками выделены зоны мембраны, в которых осуществляется регистрация связанного маркера.

мое их количество обычно варьирует от 4 до 6). Для детекторов «открытого» типа это, очевидно, необходимое условие, плата за возможность адаптировать прибор к тест-системам разных производителей.

Альтернативные маркеры для ИХ и их возможности

Магнитные маркеры. В качестве метки в ИХ могут быть использованы магнитные частицы. Обладая близкими размерами с золотыми или окрашенными латексными частицами, они слабо видны глазом, но зато легко детектируются по магнитному полю. Материалы тест-полоски никак не препятствуют магнитному полю [30], в связи с чем детекция проводится не только в верхнем слое (примерно 10 мкм), как для окрашенных частиц, а во всем объеме (толщина мембраны 150–200 мкм), что потенциально улучшает характеристики анализа (рис. 3). На результат регистрации магнитных частиц никак не влияют окрашенные компоненты пробы, которые в оптических ИХ-системах зачастую дают существенное и неравномерное фоновое окрашивание.

Успешность магнитной регистрации в ИХ продемонстрирована на примерах детекции тропомиозина [31], тропонина [32], парвальбумина [33], *Listeria monocytogenes* [34] и других объектов. Несколькими фирмами данный подход доведен до серийного выпуска детекторов (табл. 2) в комплекте со специализированными тест-системами.

Электропроводные маркеры. Для регистрации взаимодействия на тест-полоске могут использоваться маркеры, обладающие электропроводностью (обычно это металлические наночастицы) либо инициирующие генерацию/трансформацию электропроводных соединений (ферменты из класса оксидаз). Для проведения измерений зона специфического взаимодействия тест-полоски совмещается с электродом, чаще всего выполненным из неактивных соединений (золото, платина, углерод). Регистрируемыми параметрами могут быть сила тока, напряжение, сопротивление; соответствующие аналитические системы относят к амперометрическим, потенциометрическим или кондуктометрическим [35].

Примеров реализации такого анализа в сочетании с ИХ на сегодняшний день немного. Так, F. Lu и соавт. описали детекцию хорионического гонадотропина с использованием в качестве регистрируемых меток ионов металлов [36]. С. Fernández-Sánchez и соавт. предложили регистрацию импеданса электрохимического датчика с покрытием из pH-чувствительного полимерного слоя в системе для детекции простат-специфического антигена [37], а Y.-Y. Lin и соавт. для того же соединения применили регистрацию с помощью печатных электродов кадмия, высвобождающегося при растворении квантовых точек [38].

Электропроводные маркеры, как и магнитные, регистри-

руются из всего объема тест-полоски. На результаты анализа не влияют окрашенные компоненты тестируемой пробы, но при этом влияют электропроводные компоненты. Основным же фактором, который ограничивает практическое применение систем, регистрирующих изменение электрических параметров на тест-полоске, является их недостаточная чувствительность и воспроизводимость вследствие дрейфа сигнала и влияния на результат компонентов матрикса. Коммерческие электрохимические детекторы для иммунохроматографии на сегодняшний день отсутствуют. Разработки новых схем амплификации сигнала [39, 40] представляют интерес для создания высокочувствительных тест-систем, однако, по всей видимости, в ближайшем будущем они смогут претендовать лишь на качественную диагностику.

Преимущества приборной регистрации результатов ИХ-исследования

Перспективы широкого применения ИХ с приборной регистрацией, рассмотренной в настоящем обзоре, обусловлены следующими ее свойствами.

1. Документирование результатов тестирования и отсутствие субъективного фактора при их оценке (результат квалифицируется однозначно и при слабом окрашивании). Цифровое изображение теста сохраняется для перепроверки спорных результатов. Оно может служить подтверждением диагностических решений, имеющих юридические последствия (например, при тестировании на наркотики, антитела к ВИЧ и др.) [13].
2. Возможность рассматривать ИХ не только как качественный, но и как полуколичественный анализ.
3. Снижение предела детекции определяемого соединения, что может быть связано с более чувствительной детекцией метки; предел детекции может быть снижен в 3–50 раз [17, 41–43]. В конкурентном же формате ИХ предел детекции снижается вследствие его перемещения на другой участок концентрационной зависимости регистрируемого сигнала (рис. 4).

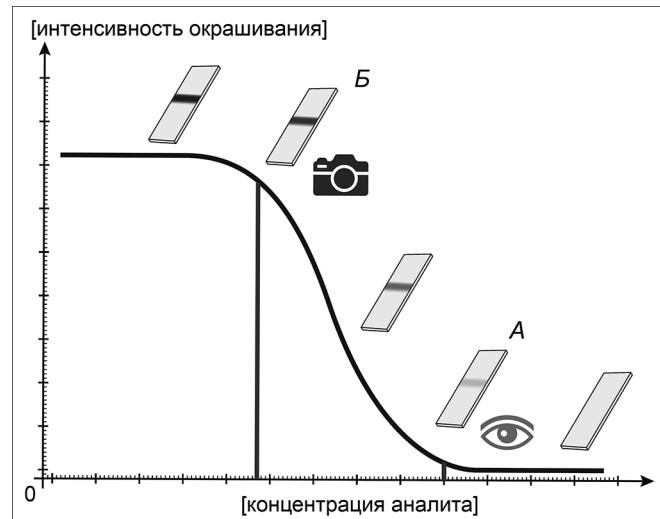


Рис. 4. Пределы детекции конкурентного иммуноанализа (по [46], с изменениями и дополнениями. При визуальной детекции фиксируется только наличие или отсутствие окрашивания, предел детекции соответствует точке А, разделяющей эти варианты. Приборная детекция регистрирует интенсивность окрашивания, которая может быть сопоставлена со значениями, введенными в память прибора. Предел детекции соответствует точке В – минимальной концентрации, вызывающей достоверное снижение интенсивности окрашивания по сравнению с отрицательной (нулевой) пробой.

ИММУНОЛОГИЯ

4. Использование мобильных средств коммуникации и интернет-интегрированных устройств (таких как Google Glass [44]) обеспечивает возможность:

- дистанционного методического сопровождения и контроля или даже управления ходом измерений;
- оперативной интеграции передаваемых результатов тестирования с данными о пациенте, имеющимися в медицинском учреждении;
- формирования облачных баз данных, например, с использованием разработок фирм Mobileassay (mobileassay.com) или Fio Corporation (fio.com);
- простой и производительной статистической характеристики результатов массовых обследований.

Как видно из представленных материалов, приборная регистрация значительно расширяет возможности ИХ. Сохраняя экспрессность, низкую стоимость и простоту использования тест-систем, детекторы обеспечивают документирование и обработку результатов, исключают субъективность их интерпретации. Эти факторы свидетельствуют о перспективности данного направления медицинской диагностики.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-16-00149).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–12, 15–17, 19–34, 36–42, 44–46
см. REFERENCES)

13. Панченко Л.Ф., Старовойтова Т.Ф., Венгеров Ю.Ю., Дзантиев Б.Б., Давыдов Б.В. Аналитические видеоцифровые комплексы экспрессных и скрининговых лабораторных исследований в наркоконтроле. *Наркология*. 2011; (12): 64–8.

14. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Туголуков А.Е., Венгеров Ю.Ю., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Видеоцифровая регистрация в лабораторной диагностике: аппаратно-программные комплексы и тест-системы. *Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией*. 2012; (6): 35–43.

18. Таранова Н.А., Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Квантовые точки как маркер в иммунохроматографических диагностических тест-системах. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2012; 4 (4): 44–7.

35. Карякина Е.Е., Карякин А.А. Электрохимические биосенсоры на основе проводящих полимеров и электроактивных поликристаллов. В кн.: Дзантиев Б.Б., ред. *Биохимические методы анализа*. М.: Наука; 2010: 91–135.

43. Урусов А.Е., Костенко С.Н., Свешников П.Г., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Определение ократоксина А иммунохроматографическим методом. *Журнал аналитической химии*. 2011; 66 (8): 884–90.

Поступила 02.09.15

REFERENCES

1. Kalorama Information Report. *The World Market for Immunoassays*. United States, New York; 2013.

2. Deutsch M.E., Louis W.M. *Test Device and Method for its Use*. Patent US № i4361537; 1982.

3. Posthuma-Trumpie G., Korf J., van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 393 (2): 569–82.

4. Schubert-Ullrich P., Rudolf J., Ansari P., Galler B., Führer M., Molinelli A. et al. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 395 (1): 69–81.

5. Ngom B., Guo Y., Wang X., Bi D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 397 (3): 1113–35.

6. Quesada-González D., Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 73: 47–63.

7. Sajid M., Kawde A.N., Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J. Saudi. Chem. Soc.* 2015; 19 (6): 689–705.

8. Blatt J.M., Allen M.P., Baddam S., Chase C.L., Dasu B.N., Dickens D.M. et al. A miniaturized, self-contained, single-use, disposable assay device for the quantitative determination of the bone resorption marker, NTx, in urine. *Clin. Chem.* 1998; 44 (9): 2051–2.

9. Askim J.R., Suslick K.S. Hand-held reader for colorimetric sensor arrays. *Anal. Chem.* 2015; 87 (15): 7810–6.

10. Gubala V., Harris L.F., Ricco A.J., Tan M.X., Williams D.E. Point of care diagnostics: status and future. *Anal. Chem.* 2012; 84 (2): 487–515.

11. Zhu H., Isikman S.O., Mudanyali O., Greenbaum A., Ozcan A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab. Chip.* 2013; 13 (1): 51–67.

12. Gui C., Wang K., Li C., Dai X., Cui D. A CCD-based reader combined with CdS quantum dot-labeled lateral flow strips for ultrasensitive quantitative detection of CagA. *Nanoscale Res. Lett.* 2014; 9 (1): 57.

13. Panchenko L.F., Starovoytova T.A., Vengerov Yu.Yu., Dzantiev B.B., Davydov B.V. Analytical video digital systems of express screening drug control. *Narcologiya*. 2011; (12): 64–8. (in Russian)

14. Starovoytova T.A., Zayko V.V., Tugolukov A.E., Vengerov Yu.Yu., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Video digital registration in laboratory diagnosis: hardware and software instruments and test systems. *Spravochnik zaveduyushchego kliniko-diagnosticheskoy laboratoriyey*. 2012; (6): 35–43. (in Russian)

15. Li Z., Wang Y., Wang J., Tang Z., Pounds J.G., Lin Y. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip. *Anal. Chem.* 2010; 82 (16): 7008–14.

16. Oh S.W., Kim Y.M., Kim H.J., Kim S.J., Cho J.S., Choi E.Y. Point-of-care fluorescence immunoassay for prostate specific antigen. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 406 (1–2): 18–22.

17. Pyo D., Yoo J. New trends in fluorescence immunochromatography. *J. Immunoassay Immunochem.* 2011; 33 (2): 203–22.

18. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Quantum dots as a marker in the immunochromatographic diagnostic test systems. *Nanotekhnologiya i okhrana zdov'ya*. 2012; 4 (4): 44–7. (in Russian)

19. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 'Traffic light' immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 255–61.

20. Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Dzantiev B.B. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405 (14): 4997–5000.

21. Yang H., Li D., He R., Guo Q., Wang K., Zhang X. et al. A novel quantum dots-based point of care test for syphilis. *Nanoscale Res. Lett.* 2010; 5 (5): 875–81.

22. Beloglazova N., Goryacheva I., Niessner R., Knopp D. A comparison of horseradish peroxidase, gold nanoparticles and quantum dots as labels in non-instrumental gel-based immunoassay. *Microchim. Acta.* 2011; 175 (3–4): 361–7.

23. Rasooly A., Herold K.E. *Mobile Health Technologies. Methods and Protocols*. New York: Springer; 2015.

24. Mudanyali O., Dimitrov S., Sikora U., Padmanabhan S., Navruz I., Ozcan A. Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab. Chip.* 2012; 12 (15): 2678–86.

25. You D.J., Park T.S., Yoon J.Y. Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. *Biosens. Bioelectron.* 2013; 40 (1): 180–5.

26. Olasagasti F., de Gordo J.C. Miniaturized technology for protein and nucleic acid point-of-care testing. *Transl. Res.* 2012; 160 (5): 332–45.

27. Coskun A.F., Wong J., Khodadadi D., Nagi R., Tey A., Ozcan A. A personalized food allergen testing platform on a cellphone. *Lab. Chip.* 2013; 13 (4): 636–40.

28. Rajendran V., Bakthavathsalam P., Ali B.J. Smartphone based bacterial detection using biofunctionalized fluorescent nanoparticles. *Microchim. Acta.* 2014; 181 (15–16): 1815–21.

29. Vashist S., Schneider E., Luong J. Commercial smartphone-based devices and smart applications for personalized healthcare monitoring and management. *Diagnostics*. 2014; 4 (3): 104–28.

30. Wang Y., Xu H., Wei M., Gu H., Xu Q., Zhu W. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Mater. Sci. Eng. C.* 2009; 29 (3): 714–8.

31. Shi L., Wang X.C., Liu Y., Lu Y. Rapid detection of shellfish major allergen tropomyosin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. In: Guo Z.N., ed. *Advanced Materials and Processes*. Pts 1–3. Trans Tech Publications Ltd: Stafa-Zurich; 2011: 436–45.

32. Xu Q., Xu H., Gu H., Li J., Wang Y., Wei M. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I. *Mater. Sci. Eng. C.* 2009; 29 (3): 702–7.

33. Zheng C., Wang X., Lu Y., Liu Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control.* 2012; 26 (2): 446–52.

34. Shi L., Wu F., Wen Y., Zhao F., Xiang J., Ma L. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407 (2): 529–35.

35. Karyakina E.E., Karyakin A.A. Electrochemical biosensors based on conductive polymers and electroactive polycrystalline. In: Dzantiev B.B., ed.

- Biochemical Analysis Methods [Биохимические методы анализа]*. Moscow: Nauka; 2010: 91–135. (in Russian)
36. Lu F., Wang K.H., Lin Y. Rapid, quantitative and sensitive immunochromatographic assay based on stripping voltammetric detection of a metal ion label. *Analyst*. 2005; 130 (11): 1513–7.
 37. Fernández-Sánchez C., McNeil C.J., Rawson K., Nilsson O. Disposable noncompetitive immunosensor for free and total prostate-specific antigen based on capacitance measurement. *Anal. Chem.* 2004; 76 (19): 5649–56.
 38. Lin Y.Y., Wang J., Liu G., Wu H., Wai C.M., Lin Y. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Biosens. Bioelectron.* 2008; 23 (11): 1659–65.
 39. Yu Q., Li H., Li C., Zhang S., Shen J., Wang, Z. Gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay with silver staining for simultaneous detection of fumonisin B 1 and deoxynivalenol. *Food Control*. 2015; 54: 347–52.
 40. Shan S., Lai W., Xiong Y., Wei H., Xu H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63 (3): 745–53.
 41. Wong R., Tse H. *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press; 2009.
 42. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products. *Anal. Chim. Acta.* 2011; 701 (2): 209–17.
 43. Urusov A.E., Kostenko S.N., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2011; 66 (8): 770–6. (in Russian)
 44. Feng S., Caire R., Cortazar B., Turan M., Wong A., Ozcan A. Immunochromatographic diagnostic test analysis using google glass. *ACS Nano.* 2014; 8 (3): 3069–79.
 45. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods.* 2015; 7 (15): 6378–84.
 46. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. *Trends Anal. Chem.* 2014; 55: 81–93.

Received 02.09.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.017.1.08

Кудрявцев И.В.^{1,2}, Серебрякова М.К.^{1,3}, Тотолян А.А.⁴

ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия; ²ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690950, г. Владивосток, Россия; ³Университет ИТМО, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия; ⁴ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования – формирование нормативных показателей по относительному и абсолютному содержанию основных популяций Т-хелперов (Th) в периферической крови условно здоровых доноров. Было обследовано 52 практически здоровых человека (29 мужчин и 23 женщины) в возрасте 18–65 лет (медиана 30 лет). Для проведения многоцветного цитофлуориметрического анализа была использована панель из следующих антител: CD45RA-FITC, CD62L-PE, CCR4-PerCP/Cy5.5, CCR6-PE/Cy7, CXCR3-APC, CD3-APC-AF750, CD4-Pacific Blue и CXCR5-Brilliant Violet 510™. Th1 были распределены по популяциям клеток с фенотипами CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-, содержащими также Th9, и CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4-, обозначаемых как Th1/Th17. Th2 выявлялись на основании наличия CCR4 при отсутствии всех остальных хемокиновых рецепторов. Th17, помимо указанных выше Th1/Th17, были обнаружены в составе CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- и CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+, причем последняя популяция также содержала Th22. Фолликулярные Th, экспрессировавшие на своей поверхности CXCR5, формировали шесть клеточных популяций со следующими фенотипами: CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- (“Tfh/Tfh2”), CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+ (“Tfh2”), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- (“Tfh17”), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+ (“Tfh17”), CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4- (“Tfh1”) и CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4- (“Tfh1/Tfh17”). Было определено относительное и абсолютное содержание Т-хелперов указанных фенотипов как в рамках общей популяции CD3+CD4+ лимфоцитов, так и среди “наивных” Т-хелперов (CD45RA+CD62L+), Т-хелперов центральной (CD45RA-CD62L+) и эффекторной (CD45RA-CD62L-) памяти, а также “терминально-дифференцированных” CD45RA-позитивных клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA+CD62L-. Полученные результаты могут быть использованы в качестве нормативных показателей при диагностике патологических состояний иммунной системы.

Ключевые слова: проточная цитометрия; хемокиновые рецепторы; субпопуляции Т-хелперов; CD45RA, CD62L.

Для цитирования: Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Значения нормы субпопуляций Т-хелперов различного уровня дифференцировки в периферической крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (3): 179-184.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-3-179-184.

Kudryavtsev I.V.^{1,2}, Serebryakova M.K.^{1,3}, Totolyan A.A.⁴

THE STANDARD VALUES OF SUB-POPULATIONS OF T-HELPER OF DIFFERENT LEVEL OF DIFFERENTIATION IN PERIPHERAL BLOOD

¹The institute of experimental medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; ²The Far-Eastern federal university, 690950 Vladivostok, Russia; ³The national research university of information technologies, mechanics and optics, 197101 St. Petersburg, Russia; ⁴The Pasteur research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

Для корреспонденции: Кудрявцев Игорь Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. иммунологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", e-mail: igorek1981@yandex.ru