

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.9-022-078

Никитина А.В.<sup>1</sup>, Помелова В.Г.<sup>1</sup>, Соколова М.В.<sup>2</sup>, Осин Н.С.<sup>3</sup>, Марданлы С.Г.<sup>4</sup>

### ДЕТЕКЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К ВОЗБУДИТЕЛЯМ TORCH-ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ФОСФАН™

<sup>1</sup> ФГУП «ГосНИИ биологического приборостроения» ФМБА РФ, лаборатория молекулярных методов диагностики инфекционных и соматических заболеваний, 125424, г. Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup> ГБУЗ г. Москвы ИКБ № 1 Департамента здравоохранения, 125367, г. Москва; <sup>3</sup> ЗАО «Иммюноскрин», 125424, г. Москва; <sup>4</sup> ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Московская область

*Разработан иммуночип для определения иммуноглобулинов (Ig) G к возбудителям четырех инфекций TORCH-комплекса (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирусная и герпесвирусная инфекции) на основе технологии ФОСФАН™. Чувствительность и специфичность одновременного выявления IgG на иммуночипе были сопоставимы с показателями коммерческих иммуноферментных тест-систем, в том числе при анализе стандартных панелей сывороток. Это позволяет рассматривать полученные результаты как основу для создания коммерческого мультиплексного теста, предназначенного для высокопроизводительного скрининга TORCH-инфекций в клинической лаборатории.*

**Ключевые слова:** мультиплексный иммуночиповый анализ на основе технологии ФОСФАН™, инфекции TORCH-комплекса, иммуноглобулины G, серологические исследования.

**Для цитирования:** Никитина А.В., Помелова В.Г., Соколова М.В., Осин Н.С., Марданлы С.Г. Детекция иммуноглобулинов G к возбудителям TORCH-инфекций методом мультиплексного иммуноанализа на основе технологии ФОСФАН™. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (5): 289-292. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-289-292

*Nikitina A.V.<sup>1</sup>, Pomelova V.G.<sup>1</sup>, Sokolova M.V.<sup>2</sup>, Osin N.S.<sup>3</sup>, Mardarly S.G.<sup>4</sup>*

THE DETECTION OF IMMUNOGLOBULINS G TO AGENTS OF TORCH-INFECTIIONS USING TECHNIQUE OF MULTIPLEX IMMUNOASSAY ON THE BASIS OF FOSFANTM TECHNOLOGY

<sup>1</sup> The state research institute of biological instrument making of the Federal medical biological agency of Russia, laboratory of molecular methods of diagnostic of infection and somatic diseases, 125424 Moscow, Russia; <sup>2</sup>The infection clinical hospital № 1 of the Moscow health department, 125367 Moscow, Russia; <sup>3</sup>Immunoscreen, 125424 Moscow, Russia; <sup>4</sup>EKOlab, 142424 Elektrogorsk, Russia

*The immune chip is developed for detecting immunoglobulins G to agents of four infections of TORCH-complex (toxoplasmosis, German measles, cytomegalovirus and herpes viral infections) on the basis of FOSFANTm technology. The sensitivity and specificity of simultaneous detection of IgG on immune chip were comparable with indices of commercial immunoenzyme test-systems, including under analysis of standard panels of serums. This permits considering derived results as a basis for development of commercial multiplex test intended for highly productive screening of TORCH-infections in clinical laboratory.*

**Keywords:** multiplex immune chip analysis on the basis of FOSFANTm technology; infections of TORCH-complex; immunoglobulins G; serological analyses.

**For citation:** Nikitina A.V., Pomelova V.G., Sokolova M.V., Osin N.S., Mardarly S.G. The detection of immunoglobulins G to agents of TORCH-infections using technique of multiplex immunoassay on the basis of FOSFANTm technology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2016; 61 (5): 289-292. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-289-292

**For correspondence:** Nikitina A.V., postgraduate student of laboratory of molecular methods of diagnostic of infection and somatic diseases. e-mail: an-na-nikitina@yandex.ru

#### Information about authors:

Nikitina A.V., <http://orcid.org/0000-0003-2373-7702>

Pomelova V.G., <http://orcid.org/0000-0003-3377-3731>

Sokolova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-5231-4891>

Osin N.S., <http://orcid.org/0000-0001-8270-1748>

Mardarly S.G., <http://orcid.org/0000-0002-4556-135X>

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

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

Received 02.09.2015  
Accepted 15.12.2015

Для корреспонденции: Никитина Анна Викторовна, аспирант лаборатории молекулярных методов диагностики инфекционных и соматических заболеваний ФГУП «ГосНИИ биологического приборостроения» ФМБА РФ, e-mail: an-na-nikitina@ya.ru

Инфекции TORCH-комплекса (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирусная и герпесвирусная инфекции) играют существенную роль в патологии плода и новорожденного, особенно при первичном инфицировании во время беременности [1]. Определение иммунного статуса в отношении этих инфекций у женщин, планирующих беременность, а также в первом и втором триместре беременности позволяет сформировать группы риска для последующего наблюдения (при негативном результате обследования на IgG) или назначить своевременное этиотропное лечение в случае выявления активной инфекции [2]. По предварительным оценкам, число ежегодных серологических исследований на каждую из инфекций TORCH-комплекса превышает 2 млн. Для их выполнения используются преимущественно моноцесты на основе иммуноферментного анализа (ИФА), поэтому объем необходимых исследований возрастает пропорционально числу выявляемых инфекций. Совершенствование методов лабораторной диагностики связывают с разработкой мультиплексных технологий, позволяющих снизить трудоемкость и стоимость исследований за счет проведения анализа на комплекс TORCH-инфекций одновременно [3—4].

В данной работе для создания мультиплексного теста применена биочип-технология ФОСФАН™ [5], эффективность которой для серологической диагностики ряда инфекций была продемонстрирована ранее [6].

Цель работы — разработать мультиплексный тест (иммуночип) для одновременного определения IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ 1/2) и краснухи, а также к *Toxoplasma gondii* на основе ФОСФАН™ и оценить его чувствительность и специфичность в сравнении с коммерческими иммуноферментными тест-системами.

**Материал и методы. Клинический материал.** В работе использованы сыворотки крови 123 больных, проходивших обследование в городской клинической инфекционной больнице №1 г. Москвы, охарактеризованные по наличию IgG к ЦМВ, ВПГ 1/2, *T. gondii* и к вирусу краснухи в коммерческих иммуноферментных тест-системах (сыворотки получены из ГКИБ №1 г. Москвы). Из числа этих сывороток 19 (15,4%) содержали IgG только к одному из возбудителей, 25 (20,3%) — к двум возбудителям, 54 (43,9%) — к трем возбудителям, 23 (18,7%) — к четырем возбудителям. Все пробы до исследования хранили в виде аликвот при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Число циклов замораживания и оттаивания не превышало двух.

**Выполнение ИФА.** Выявление IgG к ЦМВ, ВПГ 1/2, *T. gondii* или к вирусу краснухи проводили в иммуноферментных тест-системах CMV-IgG-ELISA PKS (Medac, Германия), Anti-HSV-1 ELISA (IgG), Anti-HSV-2 ELISA (IgG), Anti-Toxoplasma gondii (IgG) ELISA (Euroimmun, Германия), ИФА-краснуха-IgG (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск) соответственно. Положительные результаты анализа на ВПГ 1/2 получали суммированием положительных результатов при раздельном тестировании на каждый тип ВПГ в соответствующей тест-системе. Учет и анализ результатов проводили в соответствии с инструкцией производителя.

**Антигены для ФОСФАН.** В составе иммуночипа для одновременного определения IgG к возбудителям TORCH-инфекций использовали рекомбинантный мозаичный антиген, содержащий иммунодоминантные последовательности белков pp150, pp52, pp28 и gB цитоме-

галовируса, смесь очищенных культуральных цельновирионных антигенов ВПГ 1-го и 2-го типов, штаммы MS и G (АТСС) (оба препарата производства ЗАО «ЭКОлаб»), а также нативный токсоплазменный антиген, штамм RH (получен методом фильтрации и последующего ультрацентрифугирования из интраперитонеального экссудата мышей) и очищенный ультрацентрифугированием культуральный цельновирионный антиген вируса краснухи, штамм HPV77 (оба препарата производства Biokit, Испания).

Эти антигены были напечатаны на дне лунки стандартного 96-луночного полистиролового микропланшета (Нунк, Дания) с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «Имуноскрин»), по 4 микрозоны (диаметром 0,5 мм) на каждый антиген (всего 16 микрозон). Концентрация антигенов для печати — 100 мкг/мл. Буфер для сорбции — 0,1М КББ, pH 9,6, содержащий 5% глицерина ("Sigma", США). После инкубации в течение суток при  $2-8^{\circ}\text{C}$  и последующей трехкратной отмывки и блокировки (1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ ) микропланшет высушивали, помещали в пластиковый пакет и хранили до исследования в холодильнике.

**Выполнение мультиплексного теста.** ФОСФАН проводили по методикам, аналогичным описанным ранее [6]. Исследуемые образцы сыворотки крови, предварительно разведенные 1:100 в 0,01 М ФСБ, pH 7,4, вносили по 100 мкл в лунки микропланшета с напечатанными антигенами и инкубировали 2 ч на шейкере при комнатной температуре. Затем вносили биотинилированные моноклональные антитела против IgG чөлвека и универсальный проявляющий реагент (конъюгат стрептавидина с Рг-копропорфирином). После промывания и высушивания микропланшета регистрировали результаты анализа с помощью фосфоресцентного биочип-анализатора ИФИ-04 (ФГУП «ГосНИИБП»). Результат исследования пробы считали положительным (IgG выявлены), если коэффициент позитивности ( $K_{\text{поз}}$ ) сыворотки с данным антигеном был выше или равен 1. Значения  $K_{\text{поз}}$  рассчитывали относительно порогового уровня интенсивности фосфоресценции (ПУ), определенного предварительно в оптимизационных экспериментах, как описано ранее [6]. Значения ПУ составили 50, 30, 150 или 200 имп для определения IgG к ЦМВ, ВПГ 1/2, *T. gondii* или к вирусу краснухи, соответственно.

**Контрольные материалы.** Для оценки качества измерений методом ФОСФАН использовали контрольные материалы с известным содержанием IgG к ЦМВ или ВПГ 1/2, в том числе:

— стандартную панель сывороток, содержащих ( $n = 20$ ) и не содержащих ( $n = 16$ ) антитела класса G к ЦМВ (Стандарт АТ-G (+/-)ЦМВ, ОСО42-28-360-01, ЗАО МБС, г. Новосибирск);

— панель сывороток, содержащих ( $n = 20$ ) и не содержащих ( $n = 1$ ) антитела класса G к ЦМВ (Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel, SeraCare Life Sciences Inc., США);

— стандартную панель сывороток, содержащих ( $n = 20$ ) и не содержащих ( $n = 16$ ) антитела класса G к ВПГ (Стандарт АТ-G (+/-)ВПГ, ОСО42-28-373-04, ЗАО МБС, г. Новосибирск).

**Статистическая обработка результатов.** Выявление статистически значимых различий выборок по качественным показателям (сравнение долей) проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера для уровня статистической значимости  $p \leq 0,05$ .

Таблица 1

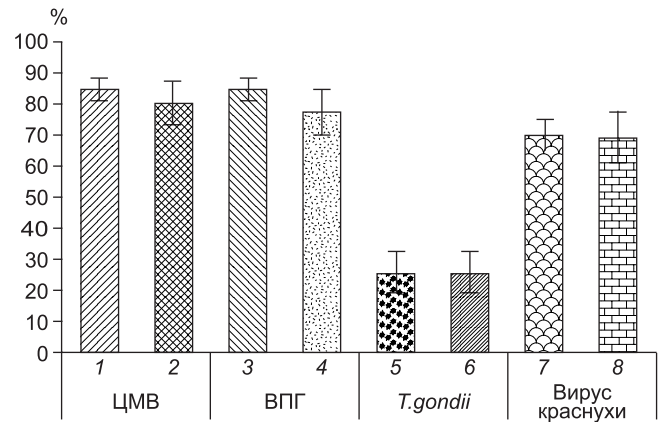
Структура результатов ФОСФАН при детекции IgG к возбудителям инфекций TORCH-комплекса в сыворотках крови пациентов (n = 123)

Характеристика сывороток в ИФА	Число проб	Число (в %) положительных проб в ФОСФАН, содержащих IgG к возбудителю:			
		ЦМВ	ВПГ	<i>T. gondii</i>	вирусу краснухи
Выявлены IgG (всего)	121	101	95	31	86
В том числе к возбудителю:					
— ЦМВ	7	5	—	—	—
— ВПГ	6	1	5	—	—
— вирусу краснухи	6	—	—	—	6
— <i>T. gondii</i>	—	—	—	—	—
— ЦМВ и ВПГ	17	17	13	—	1
— ВПГ и вирусу краснухи	4	—	4	—	4
— ЦМВ и вирусу краснухи	3	3	—	—	3
— ЦМВ и <i>T. gondii</i>	1	1	—	1	—
— ЦМВ, ВПГ и вирусу краснухи	47	44	45	—	46
— ЦМВ, ВПГ и <i>T. gondii</i>	4	4	4	4	—
— ЦМВ, <i>T. gondii</i> и вирусу краснухи	2	2	—	2	2
— ВПГ, <i>T. gondii</i> и вирусу краснухи	1	1	1	1	1
— ЦМВ, ВПГ, <i>T. gondii</i> и вирусу краснухи	23	23	23	23	23
IgG не выявлены	2	—	—	—	—

Примечание. Прочерк соответствует отрицательному результату исследования.

**Результаты и обсуждение.** При анализе методом ФОСФАН частота выявления положительных проб, содержащих IgG к ЦМВ, ВПГ 1/2, *T. gondii* или вирусу краснухи, составила 80,5 (73,3—87,7)%, 77,2 (69,6—84,8)%, 25,2 (18,4—33)% или 67,5 (59,3—75,7)%, соответственно (в скобках приведено значение 95% доверительного интервала показателя частоты). Близкие показатели чувствительности получены в коммерческих иммуноферментных тест-системах (см. рисунок). Эти данные свидетельствуют о сопоставимой чувствительности мультиплексного теста, выявляющего антитела класса G к четырем возбудителям одновременно, и метода ИФА для раздельного определения IgG.

Наличие в сыворотках IgG к двум, трем или четырем возбудителям одновременно не влияло на чувствительность и специфичность определения IgG с гомологичным антигеном. Из общего числа проб, не содержащих IgG к ЦМВ (n = 19), ВПГ 1/2 (n = 21), *T. gondii* (n = 92) или вирусу краснухи (n = 37), правильно определены 17 (89,5%), 21 (100%), 92 (100%) и 36 (97,3%) проб соответственно, что свидетельствует о высокой специфичности метода ФОСФАН. Пробы, в которых, по данным ИФА, не вы-



Частота выявления положительных проб, содержащих IgG к ЦМВ, ВПГ 1/2, *T. gondii* или вирусу краснухи, методами ИФА (столбцы с вертикальной штриховкой) и ФОСФАН; указан 95% доверительный интервал показателя частоты.

По оси абсцисс — вид возбудителя; по оси ординат — частота выявления положительных проб, %.

явлены антитела ни к одному из 4 возбудителей, в ФОСФАН также определены как отрицательные (табл. 1).

Разработанный иммуночип обеспечивал правильное определение IgG к ЦМВ и ВПГ 1/2 в большинстве сывороток из состава контрольных панелей. Анти-ЦМВ или анти-ВПГ IgG были выявлены в 39 (97,5%) из 40 и в 20 (100%) из 20 положительных сывороток, содержащих антитела класса G к ЦМВ или ВПГ соответственно. При анализе отрицательных проб, не содержащих IgG к ЦМВ (n = 17), антитела не были выявлены ни в одной из них; аналогичное исследование на IgG к ВПГ продемонстрировало специфичность 87,5% (табл. 2).

В целом эти результаты свидетельствуют о возможности правильного определения IgG к возбудителям инфекций TORCH-комплекса и подтверждают данные о высокой чувствительности и специфичности иммуночипа.

**Закключение.** Иммуночип, разработанный на основе технологии ФОСФАН, продемонстрировал возможность правильного определения IgG одновременно к 4 возбудителям TORCH-инфекций с чувствительностью и специфичностью, сопоставимыми с показателями коммерческих иммуноферментных тест-систем. Это позво-

Таблица 2

Результаты выявления IgG к ЦМВ и ВПГ в сыворотках контрольных панелей методом ФОСФАН

Наименование контрольной панели	Число положительных (+) и отрицательных (-) проб	Из них число (в %) положительных проб, выявляемых методом ФОСФАН
Стандарт AT-G (+/-) ЦМВ (МБС, Новосибирск)	20 (+)	20 (100%)
	16 (-)	0
Стандарт AT-G (+/-) ВПГ (МБС, Новосибирск)	20 (+)	20 (100%)
	16 (-)	2 (12,5%)
Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel (SeraCare Life Sciences Inc., США)	20 (+)	19 (95%)
	1 (-)	0

ляет рассматривать полученные результаты как основу для создания коммерческого мультиплексного теста, предназначенного для высокопроизводительного скрининга этих инфекций в клинической лаборатории.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stegmann B.J., Carey J.C. TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr. Womens Health Rep.* 2002; 2(4): 253—8.
2. Newton E. Diagnosis of perinatal TORCH infections. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1999; 42(1): 59—70.
3. Jiang L., Yu Z., Tang Z., Jiang T., Zhang C., Lu Z. Protein arrays based on biotin-streptavidin system for the simultaneous detection of TORCH infections. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008; 8(5): 2286—92.
4. Mezzasoma L., Bacarese-Hamilton T., Di Cristina M., Rossi R., Bistoni F., Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* 2002; 48(1): 121—30.
5. Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens. In: Georgiev V. St., Western K.A., McGowan J.J., eds. *Frontiers in Research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008: 233—40.
6. Pomelova V.G., Korenberg E.I., Kuznetsova T.I., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Osin N.S. C6 Peptide-Based Multiplex Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN) for Serologic Confirmation of Lyme Borreliosis. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0130048.

Поступила 02.09.15

Received 02.09.15

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.151.5-02:616.411-089.87]-074

Масляков В.В., Киричук В.Ф., Цымбал А.А., Дралина О.И., Куликов С.А.

### ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО СИНДРОМА ДИССЕМИНИРОВАННОГО ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПОВРЕЖДЕННОЙ СЕЛЕЗЕНКОЙ В ОТДАЛЕННОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Филиал частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов Министерства образования и науки РФ, 410012, г. Саратов, Российская Федерация

*Проведено изучение состояния коагуляционного гемостаза у 70 пациентов, ранее перенесших повреждение селезенки в результате закрытой травмы живота. С момента хирургического вмешательства прошло не менее одного года. Возраст обследованных больных колебался от 20 до 50 лет, средний возраст составил 45±2 года. Мужчин было 50, женщин – 20. Из них 50 пациентам была выполнена спленэктомия, 20 – органосохраняющие операции с применением CO<sub>2</sub>-лазера. Группу сравнения составили 30 практически здоровых лиц обоего пола того же возраста. Установлено, что выполнение органосохраняющих операций при травме селезенки предотвращает развитие синдрома хронического диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) крови, у пациентов после спленэктомии обнаружены признаки этого процесса, при этом клинических данных не выявлено, т. е. можно утверждать о наличии хронического, латентно протекающего хронического ДВС-синдрома у пациентов данной категории.*

**Ключевые слова:** органосохраняющие операции на селезенке; спленэктомия; отдаленный послеоперационный период; синдром хронического диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

**Для цитирования:** Масляков В.В., Киричук В.Ф., Цымбал А.А., Дралина О.И., Куликов С.А. Диагностика хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у пациентов с поврежденной селезенкой в отдаленном послеоперационном периоде. *Клиническая и лабораторная диагностика.* 16; 61 (5):

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-292-294

Maslyakov V.V., Kiritchuk V.F., Tsimbal A.A., Dralina O.I., Kulikov S.A.

#### THE DIAGNOSTIC OF CHRONIC SYNDROME OF DISSEMINATED INTRAVASCULAR BLOOD COAGULATION IN PATIENTS WITH DAMAGED SPLEEN IN REMOTE POST-OPERATIVE PERIOD

The office of the medical university "Reaviz" in city of Saratov of the Minobrnauki of Russia, 410012 Saratov, Russia

*The study was carried out concerning analysis of coagulation homeostasis in 70 patients earlier subjected to damage of spleen because of closed trauma of abdomen. From the moment of surgical intervention passed no less than one year. The age of the examined patients varied from 20 to 50 years. The average age made up to 45±2 years. The males amounted to 50 and females - to 20. The splenectomy was executed in 50 patients out of all. The organs-preserving operations using CO<sub>2</sub>-laser were executed in*

Для корреспонденции: Масляков Владимир Владимирович, д-р мед. наук, проф., проректор по научной работе и связям с общественностью Филиал частного учреждения образовательной организации высшего образования "Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов, e-mail: maslyakov@inbox.ru