

ИММУНОЧИП ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

*Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Сперанская А.С., Шишова А.В., Судьина А.Е.,
Алексеева Ю.А., Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А.*

*ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва,
Россия.*

Введение

В группе вирусных гепатитов человека особое место занимает гепатит С (HCV), что прежде всего связано с его широкой распространенностью и высоким хронизирующим потенциалом. Внедрение в практику здравоохранения диагностических препаратов 3 поколения с использованием рекомбинантных белков и/или синтетических пептидов, кодируемых core-, NS3-, NS4-, NS5- регионами генома HCV, позволило свести до минимума риск посттрансфузионного заражения HCV. Вместе с тем, обследование больных нередко ограничивается определением лишь суммарных антител к вирусу гепатита С. Однако такой подход не дает возможности разграничивать острую и хроническую фазы болезни, прогнозировать течение и исходы гепатита С, что может иметь преимущественное значение для своевременного назначения противовирусной терапии. Кроме того, эпитопная поливалентность HCV-антигенов в полной мере отражает неоднородность спектра антител к вирусу гепатита С. Динамика антител к антигенам HCV неодинакова, что имеет важное диагностическое значение.

Раздельное выявление антител к структурным и неструктурным антигенам гепатита С является одним из путей совершенствования серологической диагностики HCV-инфекции сегодня. Как правило, тест-системы, построенные на этом принципе, обладают более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению со стандартными диагностическими препаратами и используются на стадии подтверждения положительных результатов скрининга. Для этой цели используют либо иммуноблоттинг, либо иммуноферментные тесты с отдельно иммобилизованными на планшетах антигенами вируса гепатита С. Иммуноблоттинг основан на определении антител к различным антигенам (С, NS3, NS4 и NS5), которые в виде дискретных фракций фиксируются на нитроцеллюлозной мембране. Следует отметить, что стоимость такого подтверждающего анализа высока из-за дороговизны данных препаратов, преимущественно зарубежного производства. С другой стороны, более дешевое и доступное использование в качестве конформаторных тестов ИФА-диагностикумов с раздельной иммобилизацией антигенов требует значительного расхода биологического материала (сыво-

ротки или плазмы крови человека) – до 200 мкл и более. В этой связи, наиболее ценным, на наш взгляд, является создание нового класса диагностических препаратов, которые способны совмещать скрининговый и подтверждающий анализ в одном формате с использованием минимального объема биологического материала. Сегодня это уже становится возможным, благодаря развитию новых постгеномных и нанотехнологий.

Целью нашей работы является разработка нового поколения диагностических препаратов для серологической диагностики вирусного гепатита С в формате иммуночипа.

Материалы и методы

Нами были получены более 20 вариантов высокоочищенных рекомбинантных иммунодоминантных структурных и неструктурных белков (NS3, NS4, NS5, core), отражающих особенности генотипов гепатита С, циркулирующих на территории РФ. Иммунореактивность полученных антигенов сравнивали с рекомбинантными белками и пептидами, полученными от других производителей и используемыми при конструировании коммерческих тест-систем (всего – 33 наименования антигенов). Для этого на поверхность микроскопных слайдов с альдегидным покрытием (CSS-100 Silylated Slides или VALS 25 Vantage производства CEL Associates Inc., США) с помощью робота для контактной печати «XactII» (Labnext, США) в пределах каждого эррея, предназначенного для постановки одного исследуемого или контрольного образца, были иммобилизованы вышеупомянутые антигены в рабочих концентрациях. Каждому антигену соответствовал индивидуальный спот (пятно). Проведенный сравнительный анализ иммунореактивности антигенов с положительными сыворотками панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича ОСО 42-28-310-02П серии 12 (№№ 1-16) наряду с оценкой специфичности (постановка сывороток крови человека, не содержащих антитела к вирусу гепатита С - №№ 17-24 в составе той же стандартной панели ОСО 42-28-310-02П) позволил нам отобрать ряд рекомбинантных антигенов NS3, NS4, NS5, core с целью дальнейшего конструирования иммуносорбента. Помимо рекомбинантных антигенов NS3, NS4, NS5, core, иммобилизованных на стекле в двух повторах, в состав иммуносорбента включены внутренние контроли: отрицательный контрольный образец (сорбционный буферный раствор) и иммуноглобулин человека для исключения ошибок при постановке анализа и контроля качества работы иммуночипа.

Принцип работы экспериментального иммуночипа построен на непрямом методе выявления специфических антител к возбудителю HCV с помощью флуоресцентной детекции. В качестве рабочей схемы постановки анализа был выбран трехшаговый метод, который включал инкубацию с исследуемыми сыворотками/плазмы крови человека

на иммуносорбенте в конечном разведении 1:2 в течение 60 мин при температуре 37°C, промывку слайдов рабочим раствором ФСБ-Т после каждой стадии инкубаций и 30-минутные экспозиции с конъюгатом козьих антител к IgG и IgM человека, меченых биотином, и стрептавидином, модифицированным TRITC или FITC.

Результаты анализа считывали с помощью сканера ScanArray Express (Perkin Elmer, США). Уровень специфических антител к каждому из антигенов оценивали по интенсивности флуоресценции соответствующих спотов относительно фона. Рассчитывали коэффициенты К как модульное отношение абсолютного значения флуоресценции спота (за вычетом фона) к фону. Для установления критического порога (cut off) для каждого из антигенов средние значения К контрольного отрицательного образца умножали на два. При получении К выше критического уровня регистрировали положительный результат на наличие антител к соответствующему антигену вирусного гепатита С в исследуемом образце. Образец считали положительным, если значения сигналов флуоресценции по двум и более спотам превышали или были равны cut off. Исследуемый образец считали неопределенным (сомнительным) при выявлении положительного сигнала флуоресценции для одного из антигенов. Образец считали отрицательным, если значения сигнала флуоресценции для всех спотов были меньше значения cut off.

Для оценки чувствительности разрабатываемой тест-системы было исследовано 200 образцов сывороток крови пациентов, инфицированных гепатитом С, подтвержденных на наличие антител в коммерческих ИФА-тест-системах, а также 16 образцов сывороток стандартной панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-310-02П, серия 12, сыворотки 1-16), содержащих антитела к вирусу гепатита С в низких концентрациях. В опытную группу были включены 15 сомнительных образцов скринингового обследования, которые либо не были подтверждены в конфирматорных тестах, либо были положительными на наличие антител только к одному из белков NS3, NS4, NS5 или core; 4 образца плазмы крови человека, содержащие РНК вируса и отрицательные на наличие анти-HCV; 1 образец плазмы крови от больного с отрицательными результатами повторной проверки, через 1 месяц после первичного обследования, на наличие РНК вируса и антител в коммерческих тест-системах соответствующего назначения (ранее в плазме у данного пациента были выявлены и антитела, и РНК возбудителя).

Контрольная группа включала 200 образцов сывороток/плазмы крови человека, в том числе от здоровых доноров (n=100), от лиц с аутоиммунными заболеваниями (n=20), больных гепатитами другой этиологии (n=50) и от пациентов с повышенными биохимическими показателями по содержанию билирубина, АЛТ, АСТ (n=30). Дополнительно в кон-

трольную группу были включены сыворотки ОСО 42-28-310-02П серии 12 - №№ 17-24, не содержащие антител к гепатиту С.

Результаты

Нами были подобраны оптимальные условия иммобилизации на поверхность активированных слайдов наиболее значимых структурных и неструктурных HCV-антигенов. Для улучшения морфологии спотов при нанесении и «пришивке» белков на иммуносорбенте проведены исследования по подбору условий эффективной инактивации свободной поверхности биочипа. Отработаны режимы инкубаций с исследуемым образцом и конъюгатами, оптимизирован протокол учета результатов, подобрана рабочая схема проведения серологического анализа.

Следует отметить, что на первом этапе конструирования иммуночипа при анализе сывороток крови пациентов в разведении 1:20 нами были получены сравнимые значения по чувствительности и специфичности с подтверждающими ИФА-тест-системами (НПО «Диагностические системы», ЗАО «Вектор-Бест»), построенными по принципу выявления спектра антител к четырем антигенам гепатита С (core, NS3, NS4, NS5). Однако дальнейшие наши исследования, направленные на оптимизацию процедуры проведения серологического анализа, привели к существенному улучшению показателей специфичности и чувствительности экспериментальной тест-системы по сравнению с коммерческими ИФА-диагностикумами. Одинаковые условия проведения анализа (разведение исследуемого образца 1:2) показали, что наиболее высокие титры специфических антител, содержащимися в сыворотках больных гепатитом С, были получены в экспериментальном биочипе. Как показали исследования, для проведения дифференциального анализа к различным структурным и неструктурным антигенам HCV с помощью иммуночипа требуется не более 35 мкл биологического материала, что значительно меньше, чем при постановки в ИФА-подтверждающих тестах (к 4 антигенам).

Иммуночип для детекции анти-HCV показал более высокую чувствительность по спектру выявляемых антител к структурным и неструктурным антигенам по сравнению с ИФА-подтверждающими тест-системами. Все 200 образцов сывороток крови человека, позитивные в коммерческих скрининговых и конфирматорных ИФА-тест-системах, при анализе на иммуночипе также показали положительные результаты. Кроме того, при изучении образца плазмы крови от больного с отрицательными результатами при проверке на наличие РНК вируса и антител к данному возбудителю нами был выявлен положительный спектр NS4 + core в экспериментальной тест-системе в формате иммуночипа.

Особый интерес представляли четыре образца плазмы крови человека с положительными результатами обследования на наличие РНК

вируса и отрицательными в отношении выявления антител классов G и M в коммерческих ИФА-тест-системах. В иммуночипе при постановке данных образцов регистрировали позитивные значения по белку core (1 образец), NS3 (2 образца) и NS4 (1 образец). Следует отметить, что при анализе в иммуноблоттинге в двух образцах из четырех (тест-система «ЛИА-ВГС» производства ЗАО «Ниармедик плюс») нами были отмечены слабые специфические полосы на уровне 0,5+ с антигеном NS3 (1 образец) и NS4 (1 образец). В иммуночипе также была определена положительная иммунореактивность с рекомбинантными белками NS3 и NS4, но с высокими показателями коэффициента позитивности по отношению к уровню cut off.

При анализе сомнительных сывороток крови человека (15 образцов) были выявлены 5 положительных и 2 негативных образца, что соответствовало результатам в ИФА-подтверждающих тестах и иммунном блоттинге.

Из 200 образцов сывороток крови человека контрольной группы только в одном случае выявлены позитивные значения коэффициента К к core-антигену.

Чувствительность и специфичность разработанного нами иммуночипа при постановке на стандартной панели сывороток крови ОСО 42-28-310-02П, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С, составила 100%.

Вывод

Разработанная в ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора новая тест-система в формате иммуночипа для дифференциальной серологической диагностики гепатита С обладает высокими показателями чувствительности и специфичности.