

ния мы провели еще один эксперимент. Была сделана выборка двух групп мышей: в первую группу были включены нормальные мыши с генотипами x/y (11 особей) и x/x (5 особей), во вторую – мыши с мутацией гена дистрофина с генотипом mdx/y (14 особей). Для каждого животного проводили однократный газовый анализ крови, в результате которого измеряли концентрацию гидрокарбонат-ионов HCO_3^- и парциальное давление двуокиси углерода CO_2 в крови. Результаты эксперимента представлены на рис. 5.

Сравнение при помощи F-критерия [5] двух линий регрессии, построенных по данным эксперимента, позволяет говорить об отсутствии статистически значимых различий между группами с уровнем значимости 0,20. Таким образом, вид зависимости не различался, тем не менее, группы могли различаться по абсолютным величинам параметров.

Чтобы проверить последнее предположение, мы сравнили две группы по абсолютным величинам концентрации ионов HCO_3^- и абсолютным значениям парциального давления CO_2 в крови. В обоих случаях сравнение проводилось непараметрическим критерием Манна-Уитни с поправкой Йейтса. В результате сравнения было обнаружено отсутствие статистически значимых различий между группами как по абсолютной величине концентрации ионов HCO_3^- , так и по абсолютной величине парциального давления CO_2 в крови (см. табл. 3).

Анализ полученных результатов позволяет предположить наличие у мышей с генотипом mdx/y неявного механизма компенсации, который, несмотря на повышенную относительно нормальных мышей x/x и x/y частоту дыхания, обеспечивает нормальный газовый состав крови. Поиск этого механизма станет предметом наших дальнейших исследований.

Заключение

Нами был разработан способ бесконтактного измерения частоты дыхания лабораторных мышей с абсолютной погрешностью измерений 18 вдохов/мин, который минимизирует стрессовое воздействие процесса измерений на животных. С его помощью было проведено исследование различий частоты дыхания между группой mdx -мышей с мутацией гена дистрофина и группой нормальных мышей без мутации. В результате исследования было установлено наличие статистически значимой разницы между указанными группами по величине СЧД, которая была больше для mdx -мышей, и отсутствие значимой разницы по величине СКО, что указывает на равную вари-

бельность частоты дыхания в обеих группах. Проведенный затем анализ газового состава крови выявил отсутствие значимых различий между группами по концентрации гидрокарбонат-ионов в крови и парциальному давлению углекислого газа в крови, а также по виду линейной зависимости между этими параметрами. Поэтому нами было высказано предположение о наличии скрытого механизма компенсации учащенного дыхания у mdx -мышей.

Список литературы:

1. Kliegman R.M., Behrman R.E., Jenson H.B., Stanton B.F. Muscular dystrophies. – Nelson Textbook of Pediatrics. 18th ed. Philadelphia, Pa:Saunders Elsevier, 2007: Chap. 608.
2. Rodino-Klapac L.R. et al. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy // Arch. Neurol. 2007. Vol. 64. № 9. Retrieved 1-10-2011.
3. Huang P., Cheng G., Lu H., Aronica M., Ransohoff R.M., Zhou L. Impaired respiratory function in mdx and $mdx/utrn+/-$ mice // Muscle Nerve. Feb. 2011. Vol. 43 (2). PP. 263-267.
4. Кривов Л.И., Стенина М.А., Ярыгин В.Н., Поляков А.В., Савчук В.И., Обрубов С.А., Комарова Н.В. Новая генетическая разновидность mdx -мышей: исследование особенностей фенотипа // Генетика. 2009. № 5. С. 557-561.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. 459 с.

Марина Александровна Стенина,
д-р мед. наук, профессор,
Леонид Иванович Кривов,
лаборант,
кафедра иммунологии,
РНИМУ им. Н.И. Пирогова,
Игорь Николаевич Спиридонов,
д-р техн. наук, профессор,
Александр Александрович Таранов,
аспирант,
кафедра «Биомедицинские технические системы»,
МГТУ им. Н.Э. Баумана,
г. Москва,
e-mail: stenina_ma@mail.ru

С.А. Долгушин, Е.С. Одинцова, А.Ю. Герасименко, А.В. Тронин, С.А. Терещенко

Испытания набора реагентов для мультиплексного анализа крови на инфекции TORCH-комплекса методом проточной цитофлуориметрии

Аннотация

Представлены результаты предварительных испытаний набора реагентов для многопараметровой оценки иммунного ответа человека на инфекции группы TORCH с помощью мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа *in vitro* на меченных органическим красителем полистирольных микросферах путем выявления в сыворотке крови иммуноглобулинов класса G к антигенам *Toxoplasma gondii*, *Rubella virus* и *Cytomegalovirus*. Диагностическая чувствительность разработанного набора реагентов составила 97 %.

TORCH-инфекции – это группа острых инфекционных заболеваний. Расшифровывается аббревиатура TORCH как: T – токсоплазмоз (toxoplasmosis); O – другие инфекции (others); R – краснуха (rubella); C – цитомегаловирусная инфекция (cytomegalovirus); H – герпес (herpes simplex virus).

Диагностика на наличие инфекций группы TORCH производится у беременных женщин. Особенности патогенеза заключается в том, что при *первичном* заражении эти патогены могут преодолевать плацентарный барьер и оказывать пагубное действие на все системы и органы плода, особенно на его центральную нервную систему, повышая риск выкидыша,

мертворождения и врожденных уродств ребенка. Часто поражение беременной женщины инфекциями TORCH-комплекса является прямым показанием к прерыванию беременности. Также диагностика проводится у новорожденных, поскольку вызванные данными патогенами врожденные инфекции могут приводить к летальным исходам [1]-[3].

В настоящее время основными методами анализа на инфекции TORCH-комплекса являются иммуноанализ и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данные методы применяются давно, дают достоверные и надежные результаты, но обладают рядом существенных недостатков: относительно низкой чув-

ствительностью, продолжительным временем анализа, высокой вероятностью возникновения ложноположительного результата, особенно в случае использования ПЦР.

Недавно была предложена новая технология мультиплексного анализа на основе жидких биочипов – биочипов на основе суспензий кодируемых микроносителей (суспензионных микрочастиц, или жидких биочипов) [4]-[7]. Технология основывается на использовании спектрально кодируемых микросфер (например полистирольных) с присоединенными к их поверхности распознающими молекулами (зондами). Каждая такая микросфера является отдельным элементом биочипа, который распознается по уникальному спектральному коду и характеризуется уникальной распознающей молекулой (зондом), присоединенной к его поверхности. В результате становится возможным осуществить прецизионную регистрацию именно того химического соединения (регистрируемого объекта), на идентификацию которого направлен данный элемент биочипа. Анализ осуществляется на полностью автоматизированных высокопроизводительных устройствах, использующих принципы проточной цитометрии [4]-[7]. Преимуществом мультиплексного анализа по сравнению с ИФА является существенное (в несколько раз) сокращение времени выполнения анализа, а также трудозатрат персонала и расхода реагентов. Стандартный метод проточной цитометрии основан на регистрации оптического излучения, однократно рассеянного на одиночной частице, что требует сравнительно простой системы регистрации и анализа сигнала в отличие от изучения процессов многократного рассеяния [8].

Задачей рассматриваемой работы являлись испытания разработанного набора реагентов для многопараметровой оценки гуморального иммунитета человека к инфекциям группы TORCH с помощью иммунофлуоресцентного анализа на меченных органическим красителем (ОК) полистирольных микросферах для выявления в сыворотке крови иммуноглобулинов класса G (IgG) к *T. gondii*, вирусу краснухи и цитомегаловирусу (ЦМВ) *in vitro* в условиях клинико-диагностических лабораторий, больниц и других медицинских учреждений.

Материалы и методы

Принцип проведения анализа

Исследуемую предварительно разведенную сыворотку крови смешивали с суспензией полистироловых микросфер, кодированных ОК в различной концентрации и химически связанных с антигенами патогенов. В случае наличия в сыворотке крови IgG, специфических к антигенам *T. gondii*, вируса краснухи, ЦМВ в пробе происходила реакция связывания антигена, иммобилизованного на поверхности микросферы и специфического антитела. Далее суспензию микросфер промывали и добавляли конъюгат, представляющий собой антитела, специфические к IgG человека, и меченные флуоресцентным маркером – фикоэритрином (phycoerythrin, PE). Таким образом формировался комплекс антиген/специфическое IgG-антитело/конъюгат.

Кроме микросфер, связывающихся со специфическими антителами, в смеси присутствовали микросферы, контролирующее рабочее состояние конъюгата. Такие сферы несут на своей поверхности моноклональные IgG человека, после их взаимодействия с конъюгатом формируется комплекс IgG/конъюгат. Таким образом контролируются все этапы проведения реакции, и в случае отсутствия флуоресценции на данном типе микросфер анализ необходимо повторить.

Зарегистрировать факт наличия в исследуемой сыворотке крови специфических IgG к детектируемым инфекциям можно по появлению в спектре флуоресцентного излучения, испущенного из микросферы помимо пика, соответствующего длине волны флуоресценции ОК, которыми она кодирована, а также характерного пика флуоресценции на длине волны фикоэритрина.

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: казеин (Sigma-Aldrich, США), проклин (Sigma-Aldrich),

трис-(гидроксиметил)-аминометан (Хеликон), этаноламин (Sigma-Aldrich), антиген вируса краснухи, антиген *Toxoplasma gondii*, антиген ЦМВ (ЗАО «МБС-Технология», Россия), 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота (M2933-500G, Sigma-Aldrich), PolyLink Protein Coupling Kit («Bangs Laboratories Inc.», США). Остальные используемые реактивы были отечественного производства квалификации «особо чистые»: соляная кислота, этанол, ацетон, хлорид натрия, гидроксид натрия, гидрофосфат натрия, серная кислота, перекись водорода, ацетонитрил, наборы реагентов производства ЗАО «Медико-биологический Союз» – кат. № TG-11 (ПУ № ФСР 2011/10510), VG-114 (ПУ № РЗН 2014/1512), RG-11 (ПУ № РЗН 2013/436).

Для анализа использовались полистирольные микросферы Quantum Plex Carboxyl (Cat#250, «Bangs Laboratories Inc.», США) диаметром около 6 мкм, меченные ОК (Starfire Red, длина волны возбуждения 488 нм, длина волны флуоресценции 685 нм) в различной концентрации.

Также использовались различные буферные растворы: фосфатно-солевой буферный раствор с Tween 20 (ФСБ-Т): 150 мМ NaCl, 40 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4, раствор для разведения сывороток (PPC): 1,5 М аргинин («PanGeas», США), 2,5 мМ мертиолят (тимерозал), 1х ФСБ-Т, РПРС: 1х ФСБ-Т, 0,025%-ный казеин. Образцы сыворотки крови были любезно предоставлены отделом подготовки стандартных препаратов ЗАО «Медико-биологический Союз».

Ковалентное присоединение белков к микросферам проводили набором реагентов PolyLink Protein Coupling Kit согласно инструкции производителя. Тестирование сывороток методом ИФА проводили также по инструкции производителя.

Результаты

Последовательность проведения анализа

В необходимое для проведения анализов число лунок планшета для предварительного разведения сывороток вносили по 90 мкл РПРС, затем по 10 мкл исследуемых образцов, раствор перемешивали 5 раз пипетированием. Затем в лунки фильтр-планшета вносили по 60 мкл PPC. После интенсивного перемешивания на вортексе в лунки вносили по 20 мкл суспензии специфических и контрольных микросфер и по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки крови. Содержимое лунок фильтр-планшета перемешивали. Планшет инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в темном месте. После инкубации в лунки добавляли по 200 мкл раствора ФСБ-Т и промывали 3 раза вакуумным фильтратором. Затем вносили в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора Кг, перемешивали содержимое лунок фильтр-планшета. Фильтр-планшет инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °С в темном месте. По окончании инкубации промывали планшет 3 раза ФСБ-Т. Затем добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора ФСБ-Т, перемешивали и ставили фильтр-планшет в специальный модуль для автоматической подачи проб для последующего анализа содержимого лунок на проточном цитофлуориметре.

Исследование популяций сфер на проточном цитофлуориметре

Для исследования свойств микросфер, меченных ОК с разной интенсивностью, приготовили смесь из 5 популяций.

Анализ микросфер был проведен на проточном цитофлуориметре «BD FACS CantoII» с использованием программного обеспечения «BD FACS Diva». Возбуждение флуоресценции происходило при прохождении микросферами фокального пятна аргонового лазера, охлаждаемого воздухом (мощность – 15 мВт, длина волны – 488 нм). Для детекции микросфер использовали фильтр FL-3 (Per-CP-H). Флуоресценция была учтена для PE и PerCP/PE-Cy5 каналов флуоресценции на втором (FL2) и третьем (FL3) фотоэлектронных умножителях (ФЭУ) соответственно.

Были получены данные по прямому (forward side scatter, FSC) и боковому, или угловому (side scatter, SSC), светорассе-

янию, а также по интенсивности флуоресценции микросфер (рис. 1). На графике FSC против SSC гейтировали область синглетных микросфер и далее по графику FL3 против FL2 анализировали интенсивность флуоресценции PE популяции микросфер. Данные по интенсивности флуоресценции представлены на рис. 2.

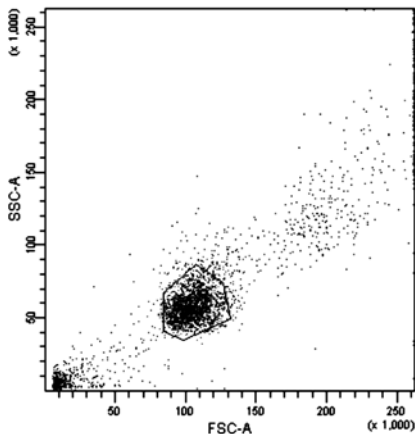


Рис. 1. Данные по прямому (FSC) и угловому (SSC) светорассеянию смеси популяций микросфер

Исследование взаимодействия отдельных популяций микросфер, несущих на поверхности антигены различных инфекций, с антителами из сыворотки крови человека

Для исследования взаимодействия IgG сыворотки крови с микросферами, на поверхности которых ковалентно присоединены различные антигены, к микросферам № 3 ковалентно присоединяли антиген *T. gondii*, после чего проводили анализ, как описано выше, и регистрировали результаты. Все индивидуальные сыворотки предварительно исследовали методом ИФА на присутствие антител к соответствующим антигенам. Аналогичные эксперименты были поставлены для микросфер с ковалентно присоединенными к их поверхности антигенами вируса краснухи (микросферы № 1) и ЦМВ (микросферы № 3). Рис. 3 иллюстрирует полученные результаты. При исследовании отрицательных сывороток облако данных располагается в первой декаде абсциссы (рис. 3б, д, з), как и при анализе контрольных микросфер данной популяции, не инкубированных с сывороткой (рис. 3а, г, ж), в то время как

при анализе положительных образцов происходит смещение облака в область более высоких значений флуоресценции по каналу FL2 PE (рис. 3в, е, и).

Из полученных данных видно, что взаимодействие конъюгата происходит специфически – только с микросферами, несущими на своей поверхности антигены патогенов и аффинно связанные с ними антитела сыворотки. Смещение облака данных по оси абсцисс происходит только после инкубации сфер с сыворотками.

После исследования сывороток отдельными популяциями специфических микросфер был сделан вывод о возможности создания мультиплексной системы для выявления трех типов специфических антител.

Исследование сывороток мультиплексной системой

Для проведения предварительных испытаний была разработана рабочая панель сывороток «РП АТ(+/-) Биолюмикс-ToRC», охарактеризованных на наличие антител к антигенам *T. gondii*, вируса краснухи и ЦМВ, состоящая из 10 образцов. В суспензии специфических и контрольных микросфер на рис. 4 к микросферам № 5 был присоединен антиген вируса краснухи, № 4 – ЦМВ, №3 – *T. gondii*, № 2 – моноклональные IgG человека. Микросферы № 1 (см. рис. 2) не использовались по причине перекрытия пиков интенсивности сфер № 1 и 2.

Результаты, полученные после проведения мультиплексного анализа сывороток рабочей панели, полностью совпали с результатами ИФА для 9 сывороток.

Также было исследовано 50 разных сывороток крови методом ИФА и мультиплексной системой. В целом было проведено 150 «индивидуальных» анализов (т. е. 50 сывороток проанализировали на 3 аналита), 146 дали корректный результат, совпадающий с полученным в ИФА. Таким образом, диагностическая чувствительность набора составляет 97 %.

Заключение

В результате выполнения работы были проведены предварительные испытания разработанного набора реагентов для мультиплексного выявления антител IgG к антигенам *T. gondii*, вирусу краснухи и ЦМВ в сыворотке крови человека методом иммунофлуоресцентного анализа на меченных органическим красителем полистирольных микросферах. Результаты проведенных предварительных испытаний набора реагентов удовлетворяют требованиям, предъявляемым к данному классу тест-систем. Установлено, что диагностическая чувствительность разработанного набора реагентов не ниже чувствительности существующих аналогичных разработок.

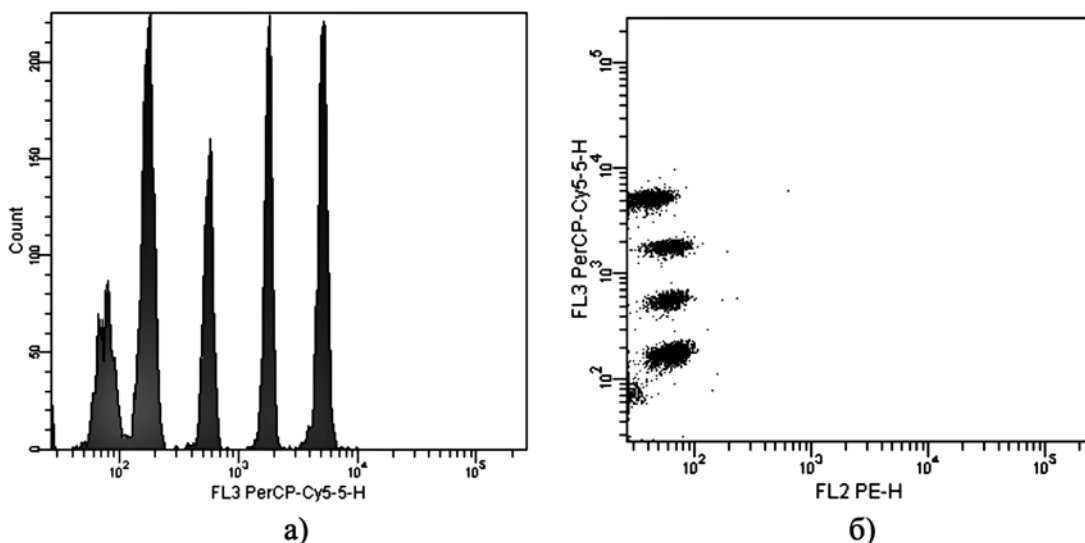


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции смеси 5 популяций микросфер относительно друг друга: регистрация выполнена при помощи цитофлуориметра «BD FACS Canto II»; пики соответствуют популяциям микросфер с 1 по 5, слева направо (а); интенсивность флуоресценции популяций микросфер в координатах (FL2, FL3); облака соответствуют популяциям микросфер с 1 по 5, снизу вверх (б)

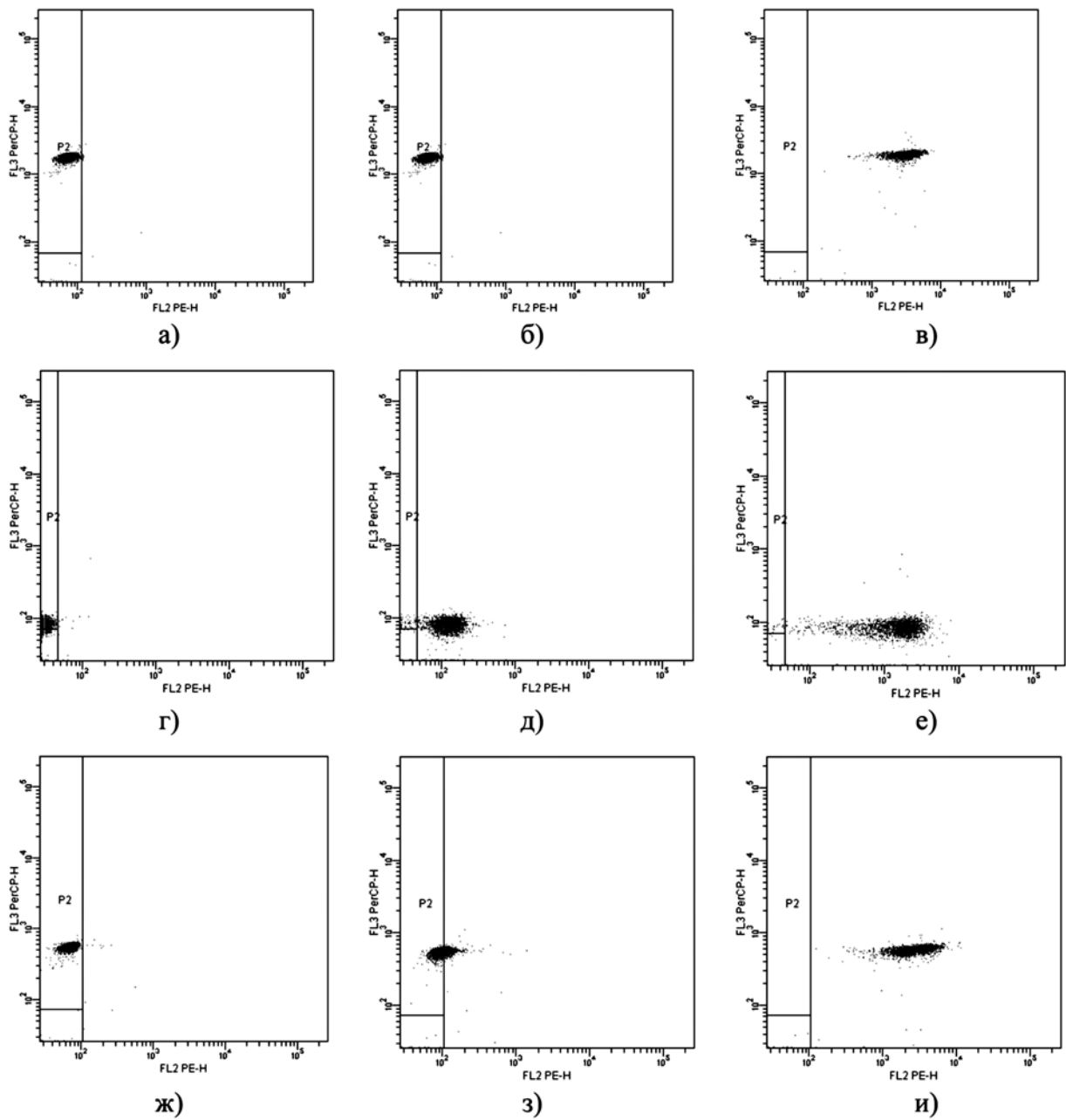


Рис. 3. Результаты исследования отрицательных (б, д, з) и положительных (в, е, и) сывороток к *T. gondii* (б, в), вирусу краснухи (д, е) ЦМВ (з, и) сывороток крови человека. Данные флуоресценции популяций микросфер, инкубированных с конъюгатом, без инкубации с сыворотками (а, г, ж)

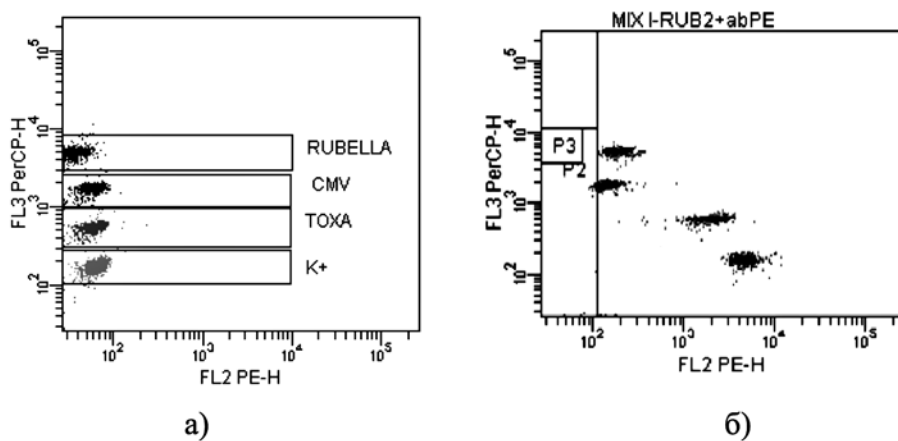


Рис. 4. Мультиплексный анализ сыворотки, положительной на наличие IgG к *T. gondii*; облака соответствуют популяциям микросфер 2, 3, 4, 5, снизу вверх: 2 – контроль конъюгата (K+); 3 – *T. gondii*; 4 – цитомегаловирус; 5 – вирус краснухи. Результаты до инкубации с сывороткой (а), после инкубации (б)

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.575.21.0090, идентификатор RFMEFI57514X0090).

Список литературы:

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 762 с.
2. Кицак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. – Кольцово: Российская медицинская академия последипломного образования МЗ РФ и ЗАО «Вектор-Бест», 2004. 82 с.
3. Васильев А.Н., Федорова Н.Е., Климова Р.Р., Адиева А.А. Совершенствование диагностики герпес-вирусных инфекций // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 6. С. 52-55.
4. Braeckmans K., De Smedt S.C., Leblans M., Pauwels R., Demeester J. Encoding microcarriers: Present and future technologies // Nat. Rev. Drug. Discovery. 2002. Vol. 1. PP. 447-456. 2478.
5. Smits G.P., van Gageldonk P.G., Schouls L.M., van der Klis F.R.M., Berbers G.A.M. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of igg serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus // Clinical and Vaccine Immunology. 2012. Vol. 19. № 3. PP. 396-400.
6. Binnicker M.J., Jespersen D.J., Harring J.A. Evaluation of three multiplex flow immunoassays compared to an enzyme immunoassay for the detection and differentiation of IgG class antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 // Clin. Vaccine Immunol. 2010. Vol. 17. PP. 253-257.
7. Binnicker M.J., Jespersen D.J., Harring J.A. Multiplex Detection of IgM and IgG Class Antibodies to Toxoplasma Gondii, Rubella Virus, and Cytomegalovirus Using a Novel Multiplex Flow Immunoassay // Clin. Vaccine Immunol. 2010. Vol. 17. № 11. PP. 1734-1738.

8. Tereshchenko S.A., Dolgushin S.A., Titenok S.A. An imperfection of time-dependent diffusion models for a determination of scattering medium optical properties // Optics Communications. 2013. Vol. 306. PP. 26-34.

Сергей Анатолиевич Долгушин,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
кафедра биомедицинских систем,
ФГАОУ ВПО «Национальный
исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Зеленоград,
Елена Сергеевна Одинцова,
канд. биол. наук, научный сотрудник,
ЗАО «МБС-Технология»,
г. Новосибирск,
Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
кафедра биомедицинских систем,
ФГАОУ ВПО «Национальный
исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Зеленоград,
Андрей Владимирович Тронин,
директор,
ЗАО «МБС-Технология»,
г. Новосибирск,
Сергей Андреевич Терещенко,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
кафедра биомедицинских систем,
ФГАОУ ВПО «Национальный
исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Зеленоград,
e-mail: dolgushin.sergey@gmail.com

А. Остадфар, Э. Равич

Влияние пульсирующего потока и обратной очистки на скорость потока плазмы при плазмаферезе. Часть 2. Эксперимент

Аннотация

В статье приведены результаты экспериментов, подтверждающих теоретические выводы о преимуществах использования метода обратной промывки при плазмаферезе [1]. При проведении опытов для создания пульсирующего потока крови, фильтруемого через полиэфирсульфоновую (PES) мембрану, был использован сердечный насос. В ходе работы было проведено сравнение различных пульсирующих потоков и их влияния на скорость фильтрата при обратной промывке. В рамках проведения эксперимента были исследованы такие гидродинамические особенности пульсирующего потока, как число Уомерсли, артериальное и среднее артериальное давление. Результаты показали, что скорость потока пермеата в системе с обратной промывкой выше, чем в системе без обратной промывки.

Обзор системы обратной промывки

В первой (теоретической) части данной статьи была описана разработанная авторами модель системы обратной промывки, позволяющая увеличить скорость потока пермеата [1]. На рис. 1 показана структура разделительной системы. Данная модель состоит из трех основных элементов: подающего канала 1, пористой стенки 2 и пропускного канала 3. Движения диафрагмы, возникающие в результате пульсации артериального давления, создают обратный поток на мембране, который способствует уменьшению ее загрязнения. Кроме того, эти колебания способствуют продвижению жидкости в канал пермеата на следующий этап очистки. Взаимосвязь скорости потока пермеата, артериального давления и частоты сердечных сокращений (сердечного ритма) описаны в теоретической части статьи [1].

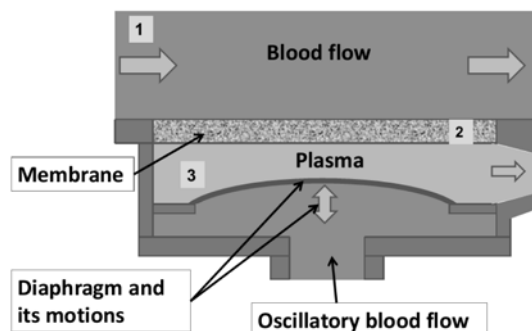


Рис. 1. Схема фильтрации и обратной промывки