

10. McSharry J.J. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 724-733.
11. Rudd R. J., Trimarchi C.V. Comparison of sensitivity of BHK21 cells and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25: 1456-1458.
12. Sydow F., Santiago M.A., Neves-Souza P.C. et al. Comparison of Dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Memento Instituto Oswaldo Cruz.* 2000, 5:483-489.
13. Steen H.B., Boye E., Starsted K. et al. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects and antibody binding. *Cytometry*, 1982, 2 (4): 249-256.
14. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A. et al. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006, 70B (5): 335-343.
15. Woldehewet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin. Chem. Acta.* 2005, 351: 49-63.

Поступила 31.10.17

Контактная информация: Кравцов Александр Леонидович, д.б.н.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.М.Кудряшова¹, А.Г.Галстян¹, Е.Б.Файзулов¹,
А.Ю.Оленин², Г.В.Лисичкин², В.В.Зверев¹, О.В.Борисова¹*

ВЫЯВЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ СИГНАЛА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Цель. Изучение возможности выявления антигена аденовируса с детекцией спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ⁺) как продукта иммуноферментной реакции. *Материалы и методы.* В работе использовали клинические фекальные образцы, содержащие аденовирусы, ротавирусы группы А, норовирусы и образцы здоровых детей, а также лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5 — 6 lg ТЦД₅₀/мл. Иммуноферментный анализ проводился в сэндвич-формате, при проведении ГКР-детекции после стадии окисления ТМБ в реакционную смесь вносили наночастицы серебра и проводили измерение спектров на рамановском анализаторе при длине волны лазера 532 нм. *Результаты.* Была получена сходимость результатов при определении аденовируса в сравнении с иммуноферментным методом с фотометрической детекцией и ПЦР. *Заключение.* Показана возможность использования ТМБ⁺ в качестве ГКР-репортера и серебряных наночастиц в качестве ГКР-субстрата для выявления антигена аденовируса в сложных биологических образцах.

Журн. микробиол., 2018, №. 3, С. 25—31

Ключевые слова: аденовирус, твердофазный ИФА, гигантское комбинационное рассеяние, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, наночастицы серебра

*А.М.Кудряшова¹, А.Г.Галстян¹, Е.Б.Файзулов¹,
А.Ю.Оленин², Г.В.Лисичкин², В.В.Зверев¹, О.В.Борисова¹*

DETECTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN BY A SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Lomonosov Moscow State University, Russia

Aim. Study of the possibility of adenovirus antigen detection by recording of surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of enzyme oxidized product of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *Materials and methods.* Clinical fecal samples containing adenoviruses, group A rotaviruses, noroviruses and healthy children samples, as well as laboratory strains of adenoviruses with a titer of 5 — 6 lg TCD₅₀/ml were used. Sandwich immunoassay was used, the Raman spectra were recorded by a Raman spectrometer (532 nm) after incubation with silver nanoparticles. *Results.* The concordance of the adenovirus detection results was obtained in comparison with the enzyme immunoassay method with colorimetric detection and PCR. *Conclusion.* The possibility of TMB⁺ using as a SERS reporter and silver nanoparticles as a SERS substrate for the detection of adenovirus antigen in complex biological samples was shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 25—31

Key words: adenovirus, enzyme-linked immunosorbent assay, surface-enhanced Raman scattering, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, silver nanoparticles

ВВЕДЕНИЕ

Разработка чувствительных и селективных методов выявления патогенных вирусов является важной задачей здравоохранения и вопросом национальной безопасности. Описан ряд подходов, основанных на ГКР-детекции результатов иммунохимического анализа, которые пригодны для выявления биомаркеров в клинических образцах, имеющих сложный состав.

Особый интерес представляет проведение анализа в планшетах из полистирола и использовании ГКР-детекции окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ⁺). Такой подход описан в работах для детекции респираторно-синцитиального вируса [4] и изоформы тропонина Т [5] с использованием в качестве ГКР-субстрата серебряных и золотых наночастиц соответственно. Метод является универсальным и позволяет использовать материальное и приборное оснащение, а также реагентную базу твердофазного иммуноферментного анализа.

В связи с этим, основная задача данного исследования состояла в изучении возможности выявления аденовирусного антигена в фекальных образцах методом, сочетающим иммуноферментный анализ и ГКР-детекцию сигнала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Fluka), пероксидазный конъюгат моноклональных антител к гексону аденовируса с протексидазой (ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», антитела мышинные моноклональные к аденовирусу-МАТ (ООО «Биолекса»). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовались прозрачные 96 луночные планшеты (Costar).

Панель клинических образцов (n=40) от детей в возрасте до 5 лет, госпитализированных в стационар с острой кишечной инфекцией, и здоровых детей. Образцы были охарактеризованы методом мультиплексной ОТ и ПЦР-РВ на наличие нуклеиновых кислот 8 групп кишечных вирусов человека: аденовирусов, ротавирусов группы А, энтеровирусов, норовирусов, астровирусов, саповирусов, орторевовирусов, ротавирусов группы С [1]. В состав панели включены образцы 1 — 10, содержащие ДНК аденовирусов со средним значением пороговых циклов (ПЦ) равном 22,5±4,9; образцы 11 — 20 — РНК ротавирусов группы А (ПЦ=16,7±3,8); образцы 21 — 30 — РНК норовирусов

(ПЦ=21,3±3,2); образцы 31 — 40, образцы, в которых нуклеиновых кислот кишечных вирусов не выявлено.

Для получения культуральных образцов аденовирусов культуру клеток HeLa заражали лабораторными штаммами аденовирусов человека 3 и 7 типа, после проявления выраженного цитопатогенного действия вирусный материал трижды замораживали-оттаивали в культуральном флаконе и осветляли низкоскоростным центрифугированием. В качестве контрольных образцов в ИФА использовали лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5 — 6 lg ТЦД₅₀/мл.

Результаты ИФА регистрировали на планшетном фотометре BioRad Model 680. Инкубацию планшет проводили на шейкере (ELMI SkyLine). Для отмывки планшет использовали вошер (BioRad PW 40). Взвешивание реактивов производилось на весах (OHAUS Discovery). Для контроля и коррекции pH использовали pH-метр (Mettler Toledo MP220). Центрифугирование производили на центрифуге (Thermo Scientific MicroCL 17 centrifuge). Учет результатов ГКР-анализа проводили на спектрометре (ИнСпектр MIXSplitter, ООО «ИнСпектр», Черногловка).

Для получения 10% фекальных экстрактов образцы собирали в стерильные пробирки в количестве 1 грамм. Далее вносили 10,0 мл в 0,02 М фосфатного буферного раствора pH 7,2 (ФБР), содержащего 0,2% БСА, 0,05% Твин-20, перемешивали. Полученную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. Для выявления антигена аденовируса использовали надосадочную жидкость.

Синтез наночастиц серебра в водной среде проводили методом восстановления нитрата серебра борогидридом натрия в присутствии стабилизатора для получения дисперсии наночастиц с содержанием серебра 100 мг/л (0,9 мМ). К 100 мл раствора стабилизатора цитрата натрия в дистиллированной воде по каплям при перемешивании прибавляли 50 мл раствора, содержащего 0,61 г (3,6 ммоль) нитрата серебра. Через 15 минут к смеси по каплям при интенсивном помешивании добавляли 50 мл водного раствора, содержащего двукратный избыток борогидрида натрия. Изучение распределения по размерам наночастиц серебра в водных дисперсиях осуществляли на анализаторе ZetasizerNano ZS с интегрированным He-Ne лазером с мощностью 4мВ и длиной волны 633 нм («MalvernInstruments» ltd., Великобритания). Измерение ζ-потенциала проводили путем наложения электрического поля на кювету с дисперсией наночастиц серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

При проведении иммуноферментного анализа в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл моноклональных антител в концентрации 10 мкг/мл в ФБР. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре 4 — 8°C и на 1 час вносили блокирующий раствор ФБР, содержащий 5% сахаразы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин-20. Для проведения исследования в лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемых образцов. После инкубирования в течение 45 минут и режиме встряхивания при 500 оборотов/мин проводили отмывку. Далее вносили по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител мыши к аденовирусу в разведении 1:500. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5мМ 3,3',5,5'- тетраметилбензидина. Через 15 минут измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 490 нм. Для измерения ГКР-спектра полученную реакционную смесь в полном объеме переносили в чистый планшет для остановки ферментативной реакции.

Далее вносили наночастицы серебра в концентрации 72 мкМ и инкубировали в течение 10 мин. Измерение проводили с использованием лазера с длиной волны излучения 532 нм и мощностью 30 мВт, время экспозиции составляло 2000 мс.

На основании исследования выборки отрицательных образцов было рассчитано пороговое значение для отсеечения образцов содержащих антиген аденовируса от отрицательных, определяемое по формулам: для фотометрической детекции: $ОП_{\text{порог}} = ОП_{\text{ср.К}} + 3\sigma$; для ГКР-детекции: $И_{\text{порог}} = И_{\text{ср.К}} - 3\sigma$, где $ОП_{\text{ср.К}}$ и $И_{\text{ср.К}}$ - среднее арифметическое значение регистрируемых сигналов для отрицательных образцов, σ — стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявления маркеров аденовирусной инфекции в образцах лабораторных штаммов аденовирусов и клинических образцах основывалось на твердофазном иммуноферментном анализе «сэндвич типа», включающем иммобилизацию антител для иммунного захвата на твердой фазе, инкубацию с исследуемым образцом и детектирующими антителами, мечеными пероксидазой. Результаты ферментативной реакции пероксидазы с перекисью водорода в присутствии 3,3',5,5'-тетраметилбензидина оценивались фотометрически или путем измерения ГКР-спектров после добавления наночастиц серебра. В работе использовались наночастицы со средним размером 7,5 нм и ζ -потенциалом -31 ± 1 мВ.

На рис. 1. представлены результаты ГКР-анализа продуктов ферментативной реакции, показывающие, что введение в систему наночастиц серебра существенным образом увеличивает интенсивность комбинационного рассеяния в областях $900 - 100$, $1500 - 1600$ см^{-1} , кроме того в области $1300 - 1400$ см^{-1} возникает интенсивный сигнал, отсутствующий в исходном спектре. Линии при 1177 см^{-1} , 1337 см^{-1} , 1600 см^{-1} обусловлены связями группы СН_3 , связями $\text{С}-\text{С}$ внутри бензольного кольца и совокупностью связей $\text{С}-\text{Н}$ соответственно [3]. Для оценки результатов детекции использовалась интенсивность пика при 1600 см^{-1} .

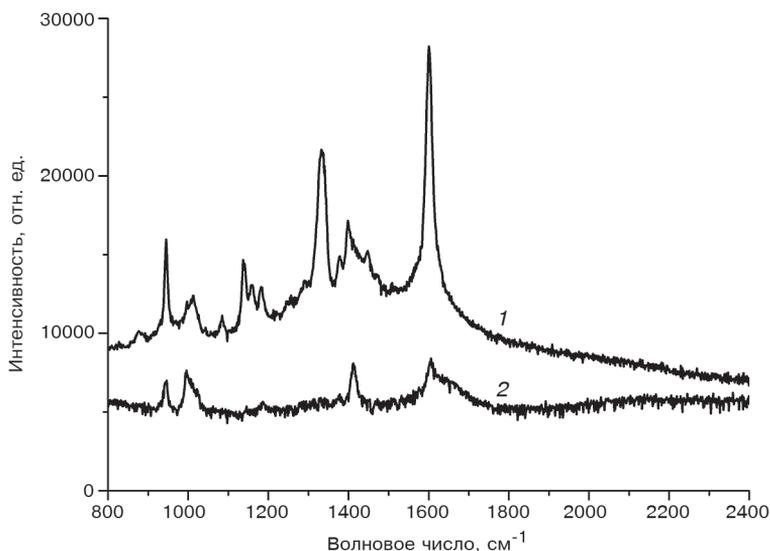


Рис. 1. ГКР-спектр ТМБ⁺ с концентрацией наночастиц серебра 72 мМ (1), спектр комбинационного рассеяния ТМБ⁺ (2).

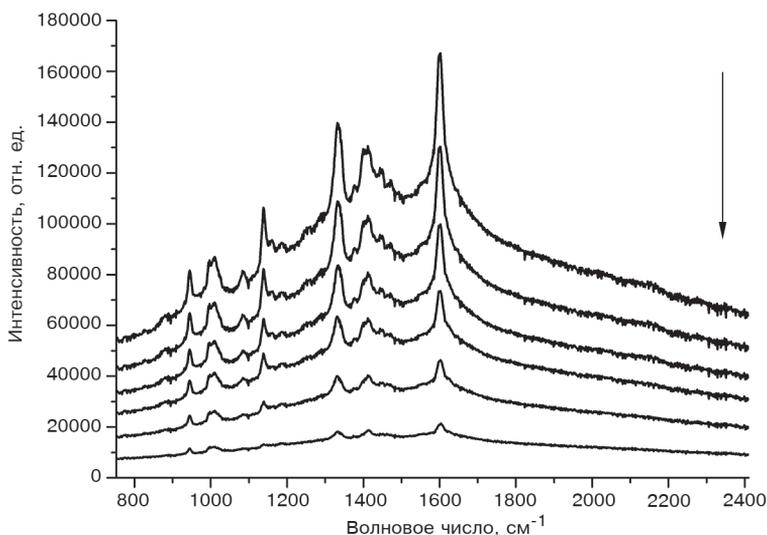


Рис. 2. ГКР-спектры ТМБ+, полученные при последовательном двукратном разведении аденовируса 3 типа (исходный титр $5 \lg$ ТЦД₅₀/мл).

Направление стрелки указывает на увеличение содержания антигена аденовируса. Для наглядности спектры смещены по оси ординат.

Концентрация наночастиц серебра 72 мкМ была выбрана как оптимальная, так как снижение концентрации приводило к уменьшению сигнала, а увеличение — к снижению воспроизводимости. Наночастицы серебра сохраняли стабильность по крайней мере в течение 4 месяцев.

Разработку методики проводили на культуральных образцах, содержащих аденовирус. На рис. 2 изображена зависимость интенсивности ГКР-спектров от концентрации исследуемого антигена. По результатам была получена обратная зависимость, и уменьшение концентрации аденовируса приводило к увеличению интенсивности ГКР-сигнала. В диапазоне рабочих разведений 1:1 — 1:64 образца, содержащего аденовирус, была получена полиномиальная зависимость интенсивности сигнала от количества аналита с коэффициентом детерминации 0,997. Коэффициент вариации (КВ, %) находился в пределах 10 — 12% при ГКР-детекции и 7 — 8% для фотометрического метода.

В табл. представлены данные по определению антигена аденовируса в фекальных экстрактах. Для дифференциальной диагностики на основании исследования образцов, не содержащих аденовирус (№ 31 — 40), было установлено пороговое значение интенсивности сигнала с учетом обратной зависимости. Также было проведено исследование специфичности на образцах, содержащих другие вирусные антигены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Была показана сходимость результатов при определении аденовируса тремя методами (табл.): твердофазным ИФА с классической фотометрической детекцией, ГКР-детекцией сигнала и методом ПЦР на панели клинических образцов, содержащих аденовирус, ротавирус и норовирус, а также на образцах здоровых детей.

Следует отметить, что возможность использования ГКР-спектров окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина обсуждается в ряде работ. Описанные разными авторами данные с использованием наночастиц серебра весьма противоречивы, получены для разного состава анализируемых образ-

Результаты выявления аденовируса в фекальных образцах разными методами

№ образца/метод	ПЦР	ИФА	ГКР	№ образца/метод	ПЦР	ИФА	ГКР
1	+	+	+	11	—	—	—
2	+	+	+	12	—	—	—
3	+	+	+	13	—	—	—
4	+	+	+	14	—	—	—
5	+	+	+	15	—	—	—
6	+	+	+	16	—	—	—
7	+	+	+	17	—	—	—
8	+	+	+	18	—	—	—
9	+	+	+	19	—	—	—
10	+	+	+	20	—	—	—
21	—	—	—	31	—	—	—
22	—	—	—	32	—	—	—
23	—	—	—	33	—	—	—
24	—	—	—	34	—	—	—
25	—	—	—	35	—	—	—
26	—	—	—	36	—	—	—
27	—	—	—	37	—	—	—
28	—	—	—	38	—	—	—
29	—	—	—	39	—	—	—
30	—	—	—	40	—	—	—

Примечание. № 11 — 20 — образцы, содержащие ротавирус, № 21 — 30 — образцы, содержащие норовирус, № 31 — 40 образцы, не содержащие кишечных вирусов.

цов и вызывают много вопросов. Полученные нами результаты также отличаются от приведенных в работах [3, 4]. Так, в работе [3] авторы пытаются доказать пероксидазо-подобные свойства наночастиц серебра и их способность разлагать перекись водорода и соответственно ставят под сомнение использование наночастиц серебра в качестве ГКР-субстрата в присутствии перекиси водорода. Авторы [4], напротив, демонстрируют результаты, указывающие на успешное использование ГКР-спектров окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии наночастиц серебра для детекции респираторно-синцитиального вируса. Однако отличием является ход зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита. Так, на рис. 2 мы представили данные, показывающие обратную зависимость интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита, тогда как в работе [4] эта зависимость является прямой.

Для разрешения этих противоречий нами были проведены дополнительные исследования. Так, для изучения возможности использования наночастиц серебра в качестве ГКР-субстрата в присутствии перекиси водорода были получены ГКР-спектры малахитового зеленого в тех же условиях в отсутствие и присутствии перекиси водорода в концентрации, соответствующей субстратной буферной смеси. Отсутствие различия в интенсивности основных пиков при 1171, 1288, 1359 и 1614 см⁻¹ указывает на тот факт, что в условиях эксперимента перекись водорода не влияла на ГКР-свойства наночастиц серебра.

Далее необходимо отметить, что при изучении зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита в широком диапазоне концентраций нами была получена колоколообразная зависимость: при низ-

ких концентрациях аналита наблюдался рост сигнала при увеличении концентрации аналита, затем зависимость меняла свой ход. Подобная картина делает затруднительным обоснование порогового значения интенсивности сигнала при исследовании образцов, содержащих и не содержащих аналит. При проведении экспериментов по выявлению аденовируса были подобраны условия, позволяющие определять аналит в широком диапазоне концентрации.

Колоколообразную зависимость можно объяснить, основываясь на тех фактах, что для получения интенсивного ГКР-сигнала необходима агрегация наночастиц. Такая агрегация наблюдается в присутствии солей [2], а также окисленной формы ТМБ [4]. Однако в соответствии с литературными и нашими данными усиление ГКР в присутствии солей зависит от их концентрации, и при превышении оптимальной концентрации наблюдается снижение сигнала, сопровождающее необратимое разрушение золя серебра. Мы предполагаем, что накопление окисленной формы ТМБ аналогичным образом влияет на агрегацию отрицательно заряженных наночастиц серебра и соответственно на интенсивность ГКР-сигнала.

Таким образом, на основании полученных данных показана возможность высокоспецифичного выявления аденовируса в сложных биологических образцах с использованием окисленной формы ТМБ и наночастиц серебра в качестве ГКР-репортера и ГКР-субстрата соответственно.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №16-15-10332.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марова А.А., Оксанич А.С., Каира А.Н., Мескина Е.Р., Медведева Е.А., Иванова О.Е., Лукашев А.Н., Кюрегян К.К., Калинин М.А., Егорова О.В., Зверев В.В., Файзулоев Е.Б. Применение метода мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики кишечных вирусных инфекций. Журн. микробиол. 2012, 6: 39-45.
2. Liang J., Liu H., Huang C. et al. Aggregated silver nanoparticles based surface-enhanced raman scattering enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive detection of protein biomarkers and small molecules. Anal. Chem. 2015, 87: 5790-5796.
3. McKeating K.S., Sloan-Dennison S., Graham D. et al. An investigation into the simultaneous enzymatic and SERRS properties of silver nanoparticles. Analyst. 2013, 138: 6347-6353.
4. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. Talanta. 2016, 148: 308-312.
5. Yu Z., Chen L., Wang Y. et al. A SERS-active enzymatic product used for the quantification of disease-related molecules. J. Raman Spectrosc. 2014, 45: 75-81.

Поступила 20.12.17

Контактная информация: Борисова Ольга Васильевна, к.х.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-54-97