

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА\*



П.В. Храмцов,  
Институт экологии и генетики  
микроорганизмов УрО РАН

Создана и оптимизирована дот-аналитическая система на базе сенсibilизированных белком p17 дисков из нитроцеллюлозной мембраны. Разработанная тест-система апробирована при помощи стандартной панели сывороток и показала 100 %-ную чувствительность и специфичность. Продемонстрирована возможность синтеза твердофазного реагента на основе кардиолипинового антигена.

*Ключевые слова:* сифилис, диагностика, дот-блот анализ, углеродные наночастицы.

### ВВЕДЕНИЕ

Заболееваемость сифилисом остается стабильно высокой в РФ в последние годы (более 30 чел. на 100 000 населения). В Пермском крае на протяжении последних 5 лет заболееваемость вдвое превышает средние показатели по РФ. Одной из главных причин этого является несовершенство системы ранней диагностики сифилиса. Именно повсеместные скрининговые исследования призваны выявлять заболевших на начальных стадиях заболевания для назначения им своевременного лечения, их изоляции и ограничения распространения инфекции.

Чувствительность применяемых нетрепонемных скрининговых методов (качественная реакция микропреципитации с кардиолипиновым антигеном и ее модификации), очевидно, недостаточна. Она составляет 90 %, что дает 10 % потенциально ложноотрицательных результатов.

Кроме того, положительные реакции наблюдаются лишь после 2–3-й недели наступления первичного сифилиса, то есть лишь спустя 6–7 недель после заражения. Столь позднее обнаружение антител к сифилису характерно для всех нетрепонемных серологических тестов, которые и используются в РФ для скрининга. Лучшие аналитические свойства демонстрируют системы, в которых для анализа используются белковые антигены трепонемы (p15, p17, p47 и др.).

Цель работы – конструирование неинструментальной твердофазной дот-иммуноаналитической системы серологической экспресс-диагностики сифилиса на основе функционализированных углеродных наночастиц, предназначенной для проведения скрининговых исследований и мониторинга эффективности терапевтических мероприятий.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке программы «УМНИК-2013 (осень)» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере 1732ГУ/2014.

## МЕТОДЫ

Синтез диагностикумов производили по оригинальной двухэтапной методике, описанной в работе М.Б. Раева [1]. Для стандартизации диагностикумов исследовали их функциональные свойства в модельных аналитических системах. Структурные свойства оценивали при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) и измерения обратного динамического рассеяния света (ОДРС). Эти два метода имеют принципиальное различие: АСМ предполагает исследование высушенного на твердой гладкой подложке образца углеродного конъюгата в концентрации на несколько порядков ниже рабочей, метод измерения ОДРС дает возможность исследовать концентрированные нативные пробы конъюгатов. Первый метод обеспечивает большую точность измерения, второй позволяет исследовать большее количество частиц, однако программная обработка результатов может приводить к погрешностям в итоговых результатах.

Для конструирования дот-иммуноаналитических систем серологической диагностики применяются два основных типа твердофазных реагентов: пористые (на основе целлюлозы, стекловолокна и др.) и непористые (как правило, на основе различных видов полистирола). Эти два типа материалов отличаются по своим свойствам. Пористые материалы имеют большую емкость по отношению к белкам, использующимся в качестве антигенов, обладают большей удельной площадью поверхности; непористые твердофазные реагенты – большей жесткостью и прочностью. В ходе наших исследований были протестированы оба типа твердофазных реагентов.

При подборе условий синтеза иммуносорбента необходимо решать проблему неспецифических взаимодействий компонентов анализа с твердой фазой. Твердая фаза, используемая в дот-анализе, обладает высокой сорбционной емкостью в отношении белков. Механизмы сорбции различны для разных типов твердых фаз:

для полистирола это, прежде всего, гидрофобные взаимодействия, для нитроцеллюлозы – электростатические и гидрофобные. Для предотвращения неспецифического связывания компонентов анализа (в первую очередь диагностикума и иммуноглобулинов сыворотки) с несенсибилизированными участками поверхности твердой фазы проводили процедуру блокирования. Для блокирования гидрофобных взаимодействий на поверхности твердой фазы использовали неионогенный детергент Твин-20. Для предотвращения неспецифической электростатической сорбции применяли ряд стандартных белковых блокаторов (бычий сывороточный альбумин, казеин, сухое молоко), из которых выбирали наилучший.

В рамках дот-блот-анализа оптимизация сводится к подбору объемов исследуемого образца, диагностикума, времени инкубации, буферных систем. В случае объемов пробы и диагностикума оптимальный объем, по своей сути, является минимально необходимым для корректной постановки анализа. Это связано с экономией реагентов и стремлением использовать как можно меньший объем биологического материала для тестирования.

Подбор оптимальной процедуры тестирования проводили, сравнивая варианты последовательного и одномоментного внесения в аналитическую систему диагностикума и исследуемой пробы. Первый вариант предполагает формирование на поверхности твердой фазы комплекса «антиген-антитело» и последующую его детекцию частицами углерод – G-белок после промывки. Вариант с одномоментным внесением проще для исполнения, не требует дополнительной промывки, однако функционализированные углеродные частицы могут при таком способе анализа взаимодействовать не только с целевыми антителами, но с любыми IgG образца. Это может негативно повлиять на чувствительность анализа. Таким образом, в данном случае необходимо было найти наилучший процедур-

ный вариант с точки зрения простоты и чувствительности теста.

Определение аналитических свойств сконструированной тест-системы можно проводить различными способами, например, использовать стандартные образцы или же клинический материал, содержание/отсутствие целевых антител в котором подтверждено референсными тестами. Как правило, при наличии коммерческой стандартной панели сывороток в первую очередь используют именно ее в качестве референса. В случае позитивных результатов при тестировании стандартной панели проводят более масштабные исследования на клиническом материале. Мы решили пойти именно таким путем. В нашей работе была использована стандартная панель производства ЗАО «Медико-биологический союз» (Россия) из 24 сывороток крови, из которых 16 содержали антитела к возбудителю сифилиса, оставшиеся 8 – нет.

Исследование стабильности иммуносорбентов играет значительную роль при

создании коммерческих тест-наборов. Ранее было продемонстрировано, что углеродные диагностикумы, которые использованы нами для создания тест-системы, имеют длительный срок хранения (более 10 лет). Таким образом, срок годности тест-набора будет зависеть главным образом от стабильности иммуносорбента. Для ее исследования в ходе первого этапа был заложен эксперимент. В основу исследований стабильности иммуносорбентов при хранении лег метод стабилизации твердофазных реагентов, разработанный М.Б. Раевым [Патент РФ № 2327992]. Для оценки сохранения свойств иммуносорбентов нитроцеллюлозные диски, сенсублизированные антигеном р17 в концентрации 0,01 мг/мл, обрабатывали 30 %-ным раствором сахарозы и высушивали. Часть стабилизированных иммуносорбентов поместили на хранение в различные температурные условия: +25 °С и 5 ± 3 °С, другую часть исследовали непосредственно после высушивания.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Исследование функциональных свойств диагностикума

Функциональные свойства диагностикума проводили в модельных диагностических системах: прямом определении IgG на полистироле (рис. 1) и определении

титра стандартной псевдотуберкулезной сыворотки из набора для постановки реакции непрямой гемагглютинации (рис. 2).

Структурные свойства, а именно размеры частиц, определяли при помощи АСМ и измерения ОДРС.

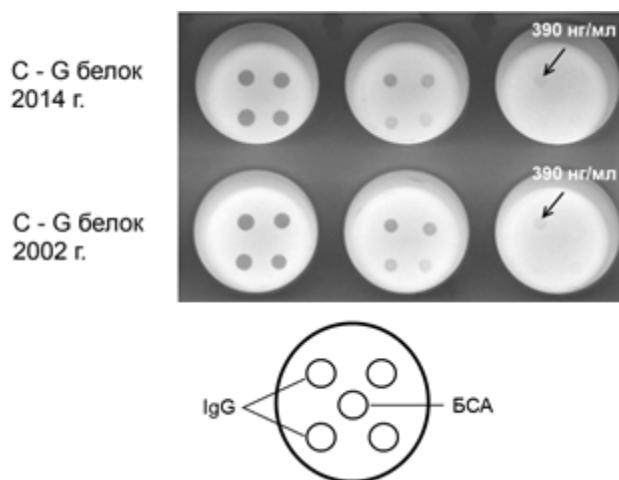


Рис. 1. Прямое определение IgG на полистироле. Стрелками отмечены последние визуализируемые точки и соответствующие концентрации IgG, БСА – отрицательный контроль

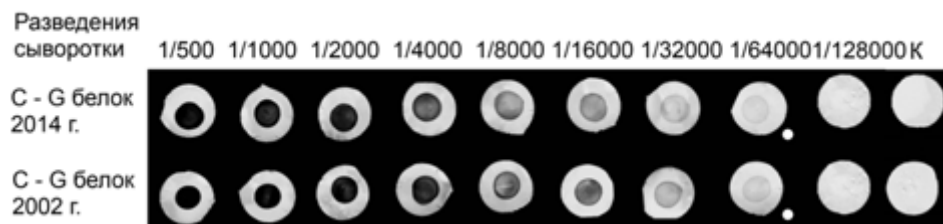


Рис. 2. Определение титра стандартной псевдотуберкулезной сыворотки.  
 К – отрицательный контроль (сыворотка крови здорового человека),  
 отмечены последние визуализируемые точки

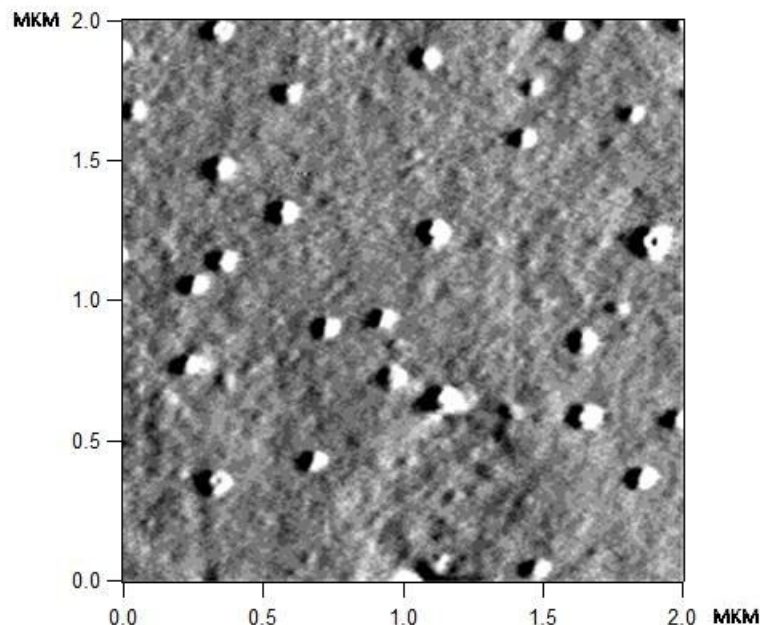


Рис. 3. АСМ-изображение функционализированных G-белком углеродных наночастиц

При измерении размеров частиц конъюгата углерод – G-белок при помощи АСМ (рис. 3) средний размер частиц составил  $98 \pm 17$  нм (ошибка среднего 1,84).

Измерение ОДРС частиц дает возможность оценить их распределение в растворе по размерам за несколько минут, метод удобен благодаря своей простоте и оперативности. Полученный график распределения частиц конъюгата по размерам продемонстрировал, что большая часть частиц имеет линейные размеры от 70 до 200 нм, а преобладают частицы размером 90–100 нм, что согласуется с результатами АСМ (рис. 4).

Свежесинтезированный диагностикум тестировали в сравнении с аналогичным диагностикумом, синтезированным более 10 лет назад. Критериями оценки были чувствительность (ее определяли по последней визуализируемой точке в ряду

серийных разведений сыворотки и IgG) и специфичность (ее оценивали по отсутствию сигнала в контрольных зонах теста). Было продемонстрировано, что применение свежесинтезированного диагностикума обеспечивает требуемую чувствительность и специфичность модельных аналитических систем.

#### Подбор оптимальных условий синтеза иммуносорбентов

Тестирование иммуносорбентов осуществляли в модельных аналитических системах, предназначенных для полуквантитативного определения антител в референсных антитрепонемных сыворотках из стандартной панели.

Для проведения анализа на нитроцеллюлозной мембране из нее изготавливали диски диаметром 5 мм. Диски сенсibilizировали, сорбируя на них 5 мкл раствора

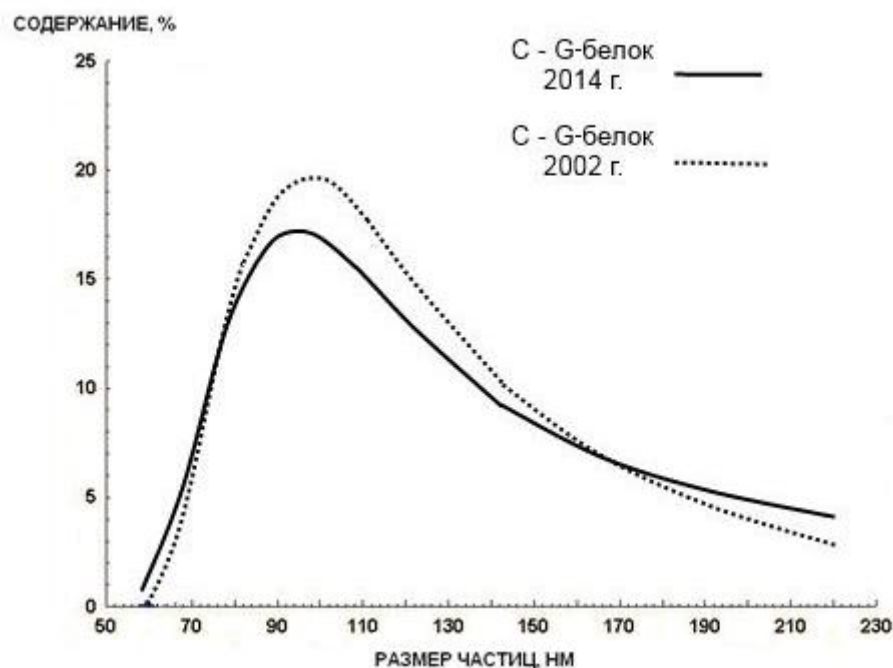


Рис. 4. График распределения по размерам функционализированных G-белком углеродных наночастиц (методом измерения ОДРС).  
В легенде указан год синтеза диагностикумов

антигена p17 в ЗФР, и высушивали. Использовали 6 серийных разведений антилиганда, кратных двум, начиная с концентрации 0,1 мг/мл. В качестве контроля на часть дисков сорбировали БСА в концентрации 0,1 мг/мл. Затем диски погружали в блокирующий раствор на 60 мин. В качестве блокаторов использовали ЗФРТ, ЗФР + 1 % БСА, ЗФР + 1 % казеин, ЗФР + 1 % сухое молоко. Контрольные диски погружали в ЗФР, не содержащий неионогенных и белковых блокаторов. После иммуносорбент промывали ЗФРТ и инкубировали в течение 30 мин с образцом референсной сыворотки, содержащей или не содержащей антитела к сифилису. Затем диски трехкратно промывали ЗФРТ и инкубировали в растворе конъюгата углеродных частиц с G-белком. Чувствительность анализа оценивали по последней визуализируемой точке в ряду серийных разведений сыворотки, специфичность – по наличию/отсутствию сигнала на контрольных дисках.

Оптимальная концентрация антигена p17 – 0,01 мг/мл (рис. 5). Она обеспечивает высокую чувствительность и специфичность детекции. Применение концен-

трации 0,1 мг/мл, повышавшей чувствительность в 2 раза, было признано нецелесообразным из соображений экономии.

При подборе оптимального блокатора оценивали эффективность снижения неспецифического сигнала, а также учитывали его влияние на аналитические характеристики анализа. Было показано, что оптимальным блокатором является ЗФРТ (рис. 6). Добавление белковых блокаторов приводило к снижению чувствительности детекции, хотя они уменьшают уровень неспецифического сигнала столь же эффективно, как и твин-20. В ходе экспериментов было выяснено, что для успешного блокирования при помощи ЗФРТ достаточно трехкратно промыть иммуносорбент этим раствором в течение 5 мин.

Для синтеза иммуносорбентов на основе непористого материала использовали планшеты из непрозрачного полистирола. На дно лунок полистирольных планшетов каплями сорбировали антиген p17 *T. pallidum* в КББ в концентрациях 0,1, 0,05, 0,01 мг/мл. В качестве отрицательного контроля на дно лунки сорбировали БСА в концентрации 0,1 мг/мл. Планшеты помещали на 30 мин во влажную камеру в

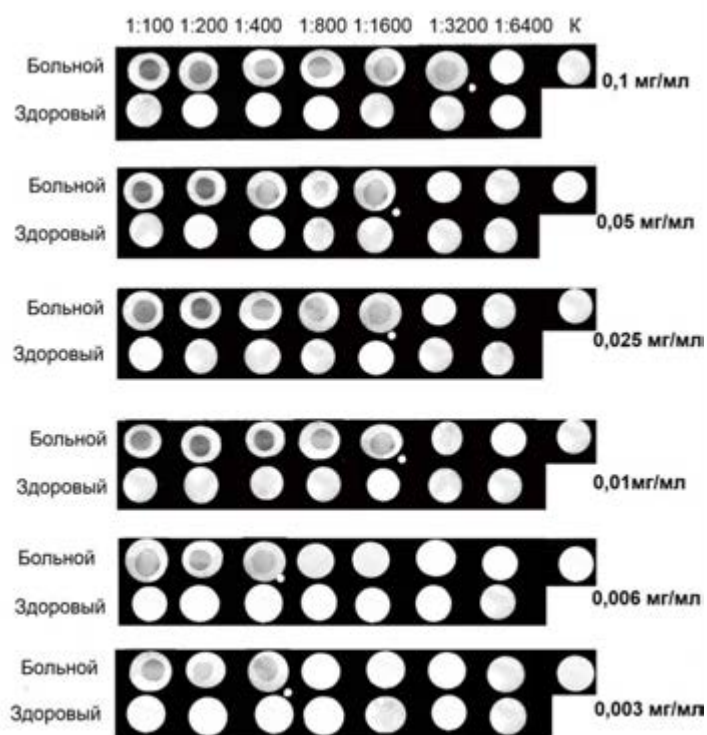


Рис. 5. Подбор оптимальной сенсibilизирующей концентрации антилиганда на нитроцеллюлозной мембране. «Больной» – ряд дисков, инкубированных с контрольной положительной сывороткой крови, «здоровый» – диски, инкубированные с контрольной отрицательной сывороткой крови. К – диски, сенсibilизированные БСА. Белой меткой показана последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений сыворотки. Справа указаны сенсibilизирующие концентрации антилиганда

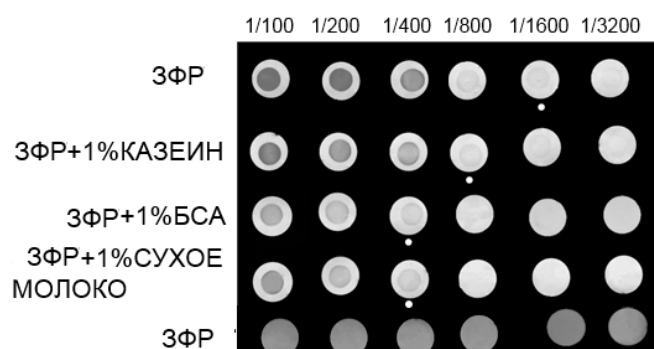


Рис. 6. Подбор оптимального блокирующего реагента. Слева указаны протестированные блокаторы. В верхней части рисунка – титры референсной положительной сыворотки крови. Последние визуализируемые точки в ряду серийных разведений сыворотки обозначены меткой. Концентрация антилиганда – белка р17 – 0,01 мг/мл

термостат ( $T = +37^{\circ}\text{C}$ ). После завершения экспозиции капли удаляли при помощи водоструйного насоса. Сенсибилизированные планшеты промывали ЗФРТ и 60 мин инкубировали при мягком перемешивании с исследуемыми референсными сыворотками крови в 8 серийных разведениях, кратных двум, начиная с разведения 1/100. Затем иммуносорбент промывали и в лунки вносили диагностикум на 15 мин. После завершения каждого этапа инкубации планшеты трехкратно промывали ЗФРТ. Результаты оценивали визуально по наличию или отсутствию окрашивания в зоне сорбции антигена. Титр сыворотки определяли по последней достоверно отличной от фона окрашенной точке в ряду серийных разведений.

Оптимальной для сенсибилизации полистирола была признана концентрация антигена р17 0,01 мг/мл, применение более высоких концентраций антилиганда не привело к увеличению чувствительности детекции. Все контроли сработали корректно (рис. 7). Чувствительность де-

текции при использовании иммуносорбентов на основе нитроцеллюлозы и полистирола была одинаковой, однако длительность инкубации с сывороткой при использовании полистирольной подложки была вдвое большей. В дальнейшем для конструирования дот-аналитической системы было решено использовать нитроцеллюлозный иммуносорбент.

#### Конструирование дот-аналитической системы и ее оптимизация

Диски из нитроцеллюлозной мембраны сенсибилизировали антигеном р17 в концентрации 0,01 мг/мл в ЗФР. Диски высушивали, помещали в лунки планшета для серологических реакций, трижды промывали ЗФРТ, а затем инкубировали с двукратными серийными разведениями (начиная с 1:100) положительной референсной сыворотки в течение 15, 30 и 60 мин. После инкубации диски вновь трехкратно промывали ЗФРТ и на 15 мин вносили диагностикум в объеме 70 мкл. Объем диагностикума был подобран эксперименталь-

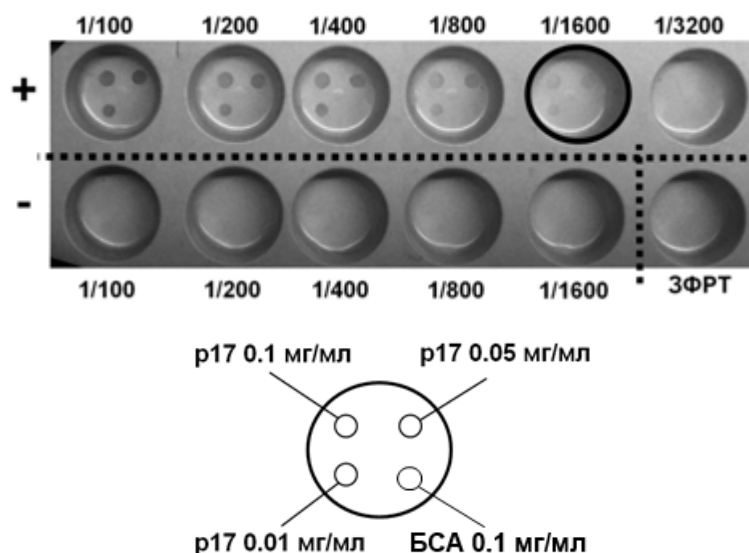


Рис. 7. Подбор оптимальной сенсибилизирующей концентрации антилиганда на полистироле.

«+» – ряд лунок, в которые вносили положительную референсную сыворотку, выше указаны ее разведения,

«-» – ряд лунок, в которые вносили отрицательную референсную сыворотку, ниже указаны ее разведения 1/100,

ЗФРТ – лунка, в которую вносили ЗФРТ.

Черным кругом обведена лунка, в которой находятся последние визуализируемые точки в ряду серийных разведений сыворотки.

Схема сорбции антигенов в лунке приведена ниже

но, как наименьший объем, обеспечивающий полноценное смачивание диска. Разведения сыворотки вносили в лунки в количестве 100 мкл. Для постановки анализа необходимо менее 10 мкл сыворотки крови, непосредственно в анализе используется многократно разведенная сыворотка крови, вследствие чего нет особого смысла минимизировать ее объем.

В альтернативном варианте тестирования производили одномоментное внесение исследуемого образца и диагностикума. При этом все процедуры были идентичны, кроме того, что диски после сенсibilизации и промывки инкубировали в 70 мкл смеси диагностикума и разведенной сыворотки. При этом сначала были подготовлены двукратные разведения сыворотки в ЗФРТ, начиная с 1:100, а затем на каждом из растворов сыворотки было приготовлено разведение диагностикума. В полученных смесях инкубировали иммуносорбенты в течение 15, 30 и 60 мин.

В результате было продемонстрировано, что оптимальная длительность инкубации составляет 30 мин для последовательного варианта внесения пробы и диагностикума. Часовая инкубация не дает какого-либо прироста чувствительности, 15-минутная инкубация приводит к двукратному снижению чувствительности анализа. Получасовая инкубация является оптимальной и при одномоментном внесении сыворотки крови и диагностикума. При этом чувствительность анализа по сравнению с последовательной инкубацией снижается в 2 раза (рис. 8). Схема внесения пробы и диагностикума, а также длительность этапов инкубации не оказывали влияния на специфичность анализа. Во всех случаях тестирование отрицательной референсной сыворотки крови не приводило к ложноположительному результату.

В дальнейшем было решено использовать вариант последовательного внесения образца и углеродного диагностикума, который хоть более продолжителен (на 15 мин), но обеспечивает более высокую

чувствительность. Подготовка пробы к анализу также проще при использовании варианта анализа с последовательным внесением, что, как указано выше, играет немалую роль для конечного потребителя.

### Тестирование сконструированной системы при помощи стандартной референсной панели сывороток

Аналитические свойства сконструированной диагностической системы оценивались при помощи стандартной панели сывороток крови производства «МедБиолСоюз». Панель содержит 24 сыворотки крови, из которых 16 положительных и 8 отрицательных. Каждая сыворотка охарактеризована при помощи ряда отечественных тест-систем, предназначенных для выявления трепонемных антител. Из всех коммерчески доступных панелей она является наибольшей, однако все равно недостаточно объемна для полной оценки диагностических свойств тест-набора. Кроме того, панель предназначена для тестирования ИФА-наборов, однако ввиду отсутствия лучшего варианта, мы использовали именно ее. Более полная оценка разработанной тест-системы может быть проведена лишь на значительном массиве клинического материала.

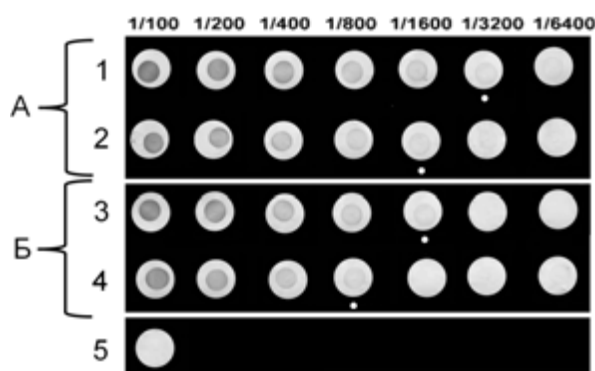


Рис. 8. Сравнение двух схем определения антител к антигену p17 в референсных сыворотках: с последовательным (1, 3) и одновременным (2, 4, 5) внесением пробы и диагностикума.

Тестировали две положительные сыворотки: А и Б, а также одну отрицательную: 5.

Титры сывороток указаны в верхней части рисунка. Отмечены последние визуализируемые точки в рядах серийных разведений сывороток



Каждая из сывороток панели была подготовлена к исследованию согласно инструкции производителя. Сыворотки тестировали в 10 серийных разведениях в ЗФРТ, начиная с 1:100. Использовалась описанная выше последовательная схема: получасовая инкубация с сывороткой и пятнадцатиминутная – с диагностикумом. Каждая из сывороток была дополнительно протестирована при помощи полуколичественной ИФА-тест-системы и МРП (рис. 9). Была продемонстрирована чувствительность и специфичность сконструированной системы на уровне 100 %. Однако, как отмечалось ранее, диагностическая панель недостаточно велика, чтобы делать окончательные выводы, кроме того, она содержит недостаточное число «сомнительных» сывороток с низким содержанием антител к возбудителю сифилиса.

**Исследование иммуносорбентов, хранившихся при различных условиях, мониторинг изменения аналитических свойств иммуносорбентов с течением времени**

Длительное сохранение иммуносорбентом аналитических свойств является важным условием создания эффективных систем диагностики. Основными повре-

дающими факторами являются протеазная активность контаминирующих твердую фазу микроорганизмов, а также колебания условий окружающей среды. Они вызывают структурно-конформационные изменения молекул антигена, приводящие к нарушению процесса распознавания антигенных детерминант антителами и снижению чувствительности и специфичности систем диагностики.

Исследование стабильности сенсibilизированных антигеном р17 нитроцеллюлозных дисков производили в предварительно подобранном оптимальном режиме: концентрация антигена для сенсibilизации составила 0,01 мг/мл, анализ проводили в варианте последовательной инкубации 30 мин с сывороткой и 15 мин с диагностикумом.

Иммуносорбент, обработанный 30 %-ным раствором сахарозы сохранил свои свойства при хранении в течение полугода при комнатной температуре и на холоду. Об этом свидетельствуют идентичные по показателям чувствительности и специфичности результаты сравнительного анализа с использованием свежесинтезированных и обработанных раствором сахарозы, хранившихся в течение 6 месяцев при +25 °С и +4 °С иммуносорбентов (рис. 10).

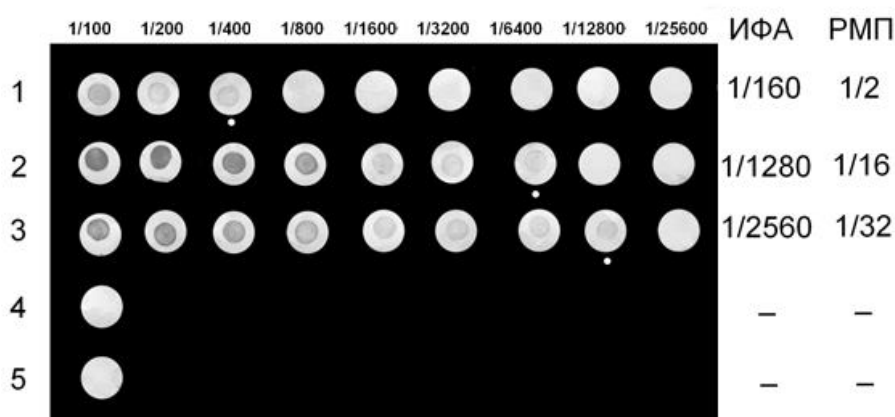


Рис. 9. Определение титра сифилитических антител к антигену р17 в положительных (1–3) и отрицательных (4, 5) референсных сыворотках крови при помощи сконструированной дот-иммуноаналитической системы.

Титры сывороток указаны в верхней части рисунка.

Для каждой сыворотки приведены данные ее исследования при помощи ИФА и МРП. Отмечены последние визуализируемые точки в рядах серийных разведений сывороток

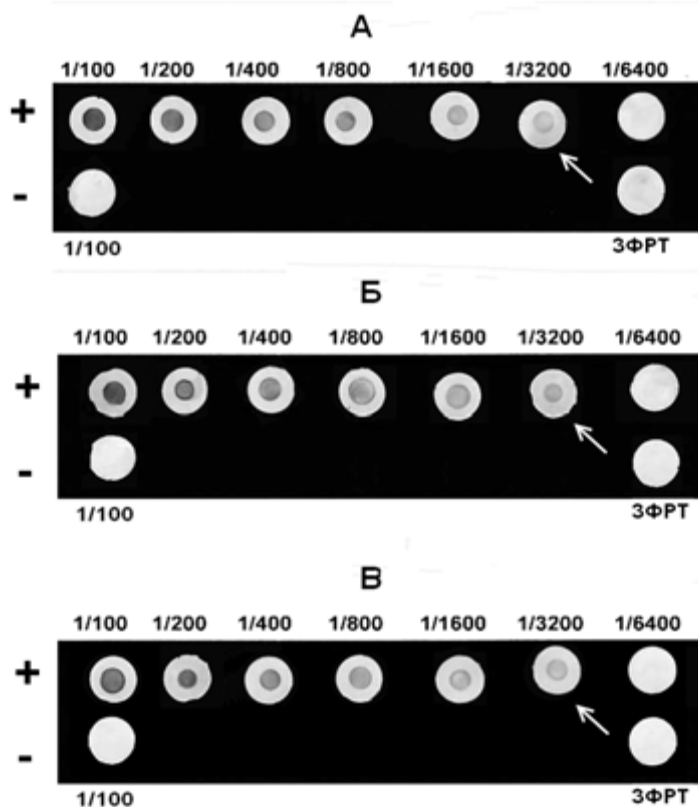


Рис. 10. Исследование изменения аналитических свойств иммуносорбентов при хранении.

А – свежесинтезированные сенсibilизированные 0,01 мг/мл антигена р17 нитроцеллюлозные диски;

Б – нитроцеллюлозные диски, сенсibilизированные 0,01 мг/мл антигена р17 хранились при температуре +25°С;

В – нитроцеллюлозные диски, сенсibilизированные 0,01 мг/мл антигена р17 хранились при температуре +4°С.

«+» – ряд дисков, инкубированных с положительной референсной сывороткой, выше указаны ее разведения,

«-» – диск, инкубированный с отрицательной референсной сывороткой в разведении 1/100,

ЗФРТ – диск, инкубированный с ЗФРТ, время указывает длительность инкубации дисков с сывороткой.

Тестирование производили в варианте последовательной инкубации с сывороткой 30 мин и 15 с конъюгатом.

Стрелкой обозначена последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений сыворотки

### Синтез иммуносорбента на основе кардиолипинового антигена

На настоящий момент разработано лишь ограниченное число твердофазных тест-систем на основе кардиолипина. Главным образом это связано с природой антигена: кардиолипин представляет собой фосфолипид, а современные материалы твердых фаз для конструирования дот-блот- и иммунохроматографических анализов ориентированы на максимальную сорбцию белков. В основном это ка-

сается нитроцеллюлозной мембраны. Наиболее распространены ИФА-наборы, в которых детектируются антитела к кардиолипину, сорбированному на полистирольной поверхности. В ходе работы мы пришли к идее создания тест-системы, позволяющей выявлять антитела не только к белковым антигенам трепонемы, но и неспецифические антитела. Подобное усовершенствование повысит информативность и диагностическую ценность тест-системы.

В ходе реализации проекта мы синтезировали иммуносорбент на основе кардиолипинового антигена (КА). В качестве твердой фазы были использованы белые непрозрачные полистирольные планшеты «Linbro». КА производства «Микроген» представляет собой раствор 0,9 % холестерина, 0,27 % лецитина и 0,03 % кардиолипина в абсолютном этаноле. Наилучшие результаты были получены при сорбции КА в 50 %-ном этаноле в объеме 1 мкл. При этом изначально цельный КА разводили в 8 раз 96 %-ным этанолом, а затем еще в два раза дистиллированной водой. При сорбции КА в абсолютном спирте наблюдается растекание антигена по поверхности твердой фазы, что делает невозможной интерпретацию результатов анализа. Снижение гидрофобности за счет добавления равного объема воды решает эту проблему и позволяет получать ровные, четко визуализируемые точки (рис. 11). Также нами было продемонстрировано, что удаление твина-20 из всех буферов, кроме того, на котором разводится конъюгат, является необходимым условием получения достоверного результата.

Тестирование сывороток из стандартной панели продемонстрировало, что наиболее интенсивный сигнал дают сыворотки с высокой концентрацией антител к кардиолипину (титр в РМП более 1:8). При исследовании низкотитражных сывороток интенсивность сигнала недостаточно велика, что негативно влияет на чув-

ствительность теста. Наиболее верным путем продолжения исследований будет использование в качестве антигена чистого кардиолипина, недорогого и коммерчески доступного препарата. В ряде публикаций [5, 6] показана возможность использования чистого кардиолипина для создания тест-систем с высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому дальнейшее совершенствование разработанной нами тест-системы в этом направлении мы видим весьма перспективным. В ходе исследований нам не удалось получить иммуносорбент на основе нитроцеллюлозы и КА, что, очевидно, связано со слишком высоким содержанием холестерина в КА [4]. Анализ литературных данных показывает, что использование для этой цели чистого кардиолипина приводит к весьма позитивным результатам [3, 4, 6].



Рис. 11. Определение антител к КА в референсных положительной и отрицательной сыворотках крови в полистирольном планшете: КА – кардиолипиновый антиген в 50 %-ном этаноле, содержание кардиолипина 0,002 %. IgG – иммуноглобулины G человека («Sigma»), сорбированы в ЗФР в концентрации 0,01 мг/мл

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы и охарактеризованы диагностические реагенты на основе функционализированных G белком стрептококка углеродных наночастиц.

Оптимизирован синтез иммуносорбентов на основе белковых антигенов *Treponema pallidum* на двух видах твердых носителей: нитроцеллюлозе и полистироле. Отработаны приемы стабилизации твердофазных реагентов, обеспечивающие сохранение их аналитических свойств при длительном хранении.

Сконструирована и оптимизирована дот-аналитическая система на базе сенсibilизированных белком p17 дисков из нитроцеллюлозной мембраны.

Разработанная тест-система апробирована при помощи стандартной панели сывороток и показала 100 %-ную чувствительность и специфичность.

Продемонстрирована возможность синтеза твердофазного реагента на основе кардиолипинового антигена.

**Библиографический список**

1. *Раев М.Б.* Нанобиотехнологии в неинструментальной иммуноаналитике / под. ред. *В.А. Демакова*, Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 140 с.
2. Патент РФ № 2327992.
3. *Costello P., Green F.* Reactivity patterns of human anticardiolipin and other antiphospholipid antibodies in syphilitic sera // *Infect. Immun.* – 1986. – Vol. 51. I. 3. – P. 771–775.
4. *Costello P., Green F.* Cholesterol effects on the interaction of cardiolipin with anti-cardiolipin antibody // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* – 1987. – Vol. 896. I. 1. – P. 52–56.
5. *Fialová L., Malbohan I., Malíčková K.* Avidity of anticardiolipin antibodies—A factor that could be important for their detection by ELISA methods // *J. Applied Biomedicine.* – 2014. – Vol. 12. I. 4. – P. 277–284.
6. *Huang Q. [et al.].* Dot-immunogold filtration assay as a screening test for syphilis. // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34. I. 8. – P. 2011–2013.

**DEVELOPMENT OF TEST FOR SYPHILIS**

P.V. Khramtsov

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the RAS*

Non-instrumental dot blot serological syphilis test based on application of functionalized carbon nanoparticles was developed and optimized. Nitrocellulose membrane sensitized with *Treponema pallidum* p17 protein served as an immunosorbent. Assay demonstrated 100 % sensitivity and specificity when tested with reference panel of serum. Possibility of detection of antibodies against cardiolipin was also shown.

*Keywords: syphilis, diagnostics, dot blot assay, carbon nanoparticles.*

**Сведения об авторе**

*Храмцов Павел Викторович*, аспирант, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; ассистент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: khramtsov Pavel@yandex.ru

*Материал поступил в редакцию 25.05.2015 г.*