Разработка метода прямой иммунофлюоресценции для выявления *Trichomonas vaginalis* и его место в лабораторной диагностике трихомониаза

Н.С. МАХЛАЙ[1], И.И. ДЕНИСОВА, В.Н. ВЕРБОВ, А.Б. ЖЕБРУН

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

The development of the direct immunofluorescence technique for the detection of *Trichomonas vaginalis* and its application to laboratory diagnostics of trichomoniasis

N.S. MAKHLAI, I.I. DENISOVA, V.N. VERBOV, A.B. ZHEBRUN

Federal budgetary institution of science Paster Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Sankt-Peterburg

Микроскопия нативного и окрашенного препаратов, несмотря на низкую чувствительность метода, широко используются в лабораторной диагностике трихомониаза. Цель исследования — разработка метода для выявления *Trichomonas vaginalis* на основе флюоресцентномеченых антител к лизату клеток *T. vaginalis* и адгезивному белку AP65. В модельном эксперименте определена чувствительность метода прямой иммунофлюоресценции для выявления *T. vaginalis* в структуре лабораторных методов диагностики трихомониаза. Показана возможность использования метода прямой иммунофлюоресценции для обнаружения *T. vaginalis* при наличии в исходном материале минимум 10^3 клеток трихомонад. Нами предложено использование метода прямой иммунофлюоресценции для подтверждения результатов культурального исследования при обнаружении в среде неподвижных клеток, морфологически сходных с клетками *T. vaginalis*.

Ключевые слова: Trichomonas vaginalis, диагностика, прямая иммунофлюоресценция.

Macroscopic studies of both native and stained preparations are extensively used in microbiological surveys despite the low sensitivity of this method. The objective of the present work was to develop a method for the detection of *Trichomonas vaginalis* with the use of fluorescence-labeled antibodies against lysates of *T. vaginalis* cells and adhesive protein AP65. Sensitivity of the direct immunofluorescence technique for the identification of *T. vaginalis* was estimated in a model experiment and compared with that of other methods available for diagnostics of trichomoniasis. It was shown that the direct immunofluorescence technique can be used to detect *T.vaginalis* in the initial material containing at least 1000 trichomonad cells. We recommend that the direct immunofluorescence technique should be employed for the identification of immobile cells morphologically similar to *T.vaginalis* cells in a medium.

Key words: Trichomonas vaginalis, diagnostics, direct immunofluorescence.

В последние годы заболеваемость трихомониазом в Российской Федерации составила около 140 случаев на 100 тыс. населения [1] Это самый высокий показатель в структуре инфекций, передаваемых половым путем. Наиболее перспективным методом лабораторной диагностики трихомониаза является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако поскольку регламентированными до сих остаются микроскопический и культуральный методы, то их совершенствование по-прежнему представляет актуальную задачу. Чувствительность серологического метода составляет немногим более 30%, поэтому его использование в лабораторной практике ограничено [2]. Повышение чувствительности и объективности микробиологических методов может быть достигнуто за счет специфического окрашивания клеток, в частности с использованием флюоресцентномеченых антител к *T. vaginalis*. В связи с этим разработка метода прямой флюоресценции (ПИФ) может иметь практическое значение. Метод менее чувствителен, чем культуральное исследование, но более чувствителен, чем микроскопия нативного препарата [3, 4]. Неоспоримым преимуществом ПИФ являются простота, скорость постановки реакции и отсутствие строгих температурных требований при проведении исследования. Необходимо отметить, что в настоящее время отечественных коммерческих тест-систем для выявления *T. vaginalis*

© Коллектив авторов, 2011

[1]e-mail: natalia.makhlay@gmail.com

Klin Dermatol Venerol 2011;6:14

методом ПИФ не существует. Это обусловлено тем, что трихомонады являются труднокультивируемыми простейшими, и это существенно осложняет стадию получения материала для иммунизации.

Цель данного исследования — выбор оптимального варианта получения антител для повышения эффективности метода ПИФ при микробиологическом выявлении *T. vaginalis*.

Материал и методы

Для получения клеточного лизата использовали восемь штаммов *T. vaginalis*, полученных из Городского кожно-венерологического диспансера (Санкт-Петербург). Очищенные штаммы *T. vaginalis* культивировали на коммерческой селективной питательной среде СВТ (НИИЭМ им. Пастера №ФСР 2009/05982), до концентрации 10^7 кл/мл. Клетки трижды отмывали в 0,9% растворе NaCl, ресуспензировали в 10 мл и дезинтегрировали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗД-2 при 22 кГц в течение 10 мин. Полученную таким образом суспензию хранили при –20 °С и в дальнейшем использовали в качестве материала для иммунизации.

Гипериммунные сыворотки получали при иммунизации 6 самок кроликов породы шиншилла массы 3,0—3,5 кг в возрасте 1—2 лет. Трех животных иммунизировали клеточным лизатом, трех других — белком AP65. Белок AP65 — наиболее изученный трихомонадный белок, выполняющий в клетке паразита две функции: он является гидрогеносомальным НАД-зависимым декарбоксилирующим ферментом и основным адгезином клетки [5]. Рекомбинантный белок AP65 фирмы «HyTest» (Финляндия) применяли в виде раствора с концентрацией 1 мг/мл, для разведения использовали фосфатно-солевой раствор pH 7,2.

Антиген вводили внутрикожно и внутримышечно, для усиления иммунного ответа при первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, который в дальнейшем заменили на неполный. Бустерные иммунизации проводили трижды с интервалом в 21 день. Нарастание антител определяли на 7, 28, 50, 70, 90-е сутки иммунизации. Специфическую активность полученных сывороток проверяли в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием белка А, ковалентно связанного с пероксидазой хрена, в качестве конъюгата.

Общеглобулиновую фракцию выделяли методом высаливания из сыворотки сернокислым аммонием (pH 7,2). Осаждение проводили трехкратно при 50% насыщения. IgG-антитела выделяли из общеглобулиновых фракций методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в градиенте хлористого натрия (pH 6,3). В полученных пиках определяли специфическую активность и белок. Конъюгацию иммуноглобулинов с флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ; «Sigma», США) проводили по стандартному протоколу конъюгирования моноклональных антител [6].

Постановка ПИФ. На обезжиренное предметное стекло наносили суспензию культуры *T. vaginalis* и готовили фиксированный спиртом препарат, на который наносили по 20 мкл раствора флюоресцирующих иммуноглобулинов в смеси с контрастирующим веществом. Для контрастирования использовали синьку Эванса и родамин. Окрашивание проводили в течение 30 мин во влажной камере при 37 °С. После этого препараты промывали фосфатным буферным раствором (pH 7,2), ополаскивали дистиллированной водой и высушивали. На высушенные препараты наносили монтировочно-иммерсионную жидкость и просматривали их с помощью люминесцентного микроскопа. Оценку свечения проводили по 4-балльной шкале в зависимости от степени свечения. Рабочим разведением конъюгатов считали результат микроскопии при обнаружении свечения, оцениваемого не ниже чем на 3 балла для всех тестируемых штаммов.

Чувствительность метода ПИФ на основе полученной смеси конъюгатов оценивали в модельном эксперименте при окраске препаратов, содержащих разные концентрации паразита. Для этого готовили серийные десятикратные разведения суспензии с концентрацией 4×10^6 клеток/мл *T. vaginalis* и из каждого разведения — препараты для окрашивания ФИТЦ-антителами. Результаты сравнивали с данными, полученными общепринятыми методами диагностики трихомониаза (микроскопия нативных и окрашенных по Романовскому—Гимзе препаратов, посев на питательную среду СВТ, ПЦР-исследование с использованием коммерческого набора реагентов Амплисенс *T. vaginalis* производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Результаты и обсуждение

При разработке вариантов иммунохимической диагностики трихомоноза прежде всего встает вопрос о получении гипериммунных сывороток, выделении из них специфических антител и приготовлении на их основе конъюгатов. Большое значение при этом имеет природа антигена и выбор схемы иммунизации. В нашем случае при использовании двух антигенов показано нарастание иммунного ответа в течение 70 сут, после чего были получены пики активности, которые не увеличивались после реиммунизации. При иммунизации лизатом клеточной массы максимальные титры сывороток в непрямом варианте ИФА составили 1:10240, а при иммунизации рекомбинантным белком AP65 титры сывороток были в 2 раза выше (рис. 1). По отработанной схеме иммунизации получены высокотитражные антитрихомонадные сыворотки, которые в

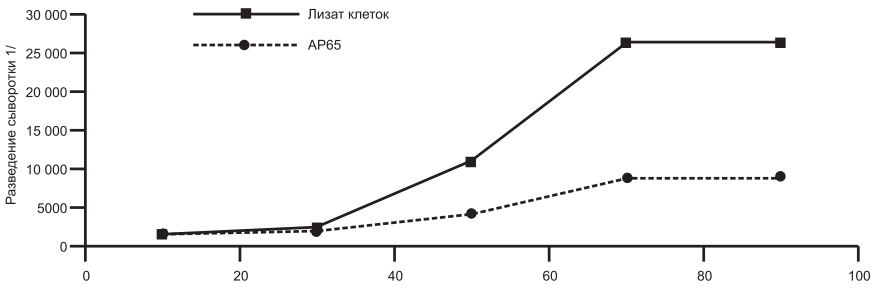


***Рис. 1*. Титры сывороток, полученных при иммунизации трихомонадными белками (n=3).**

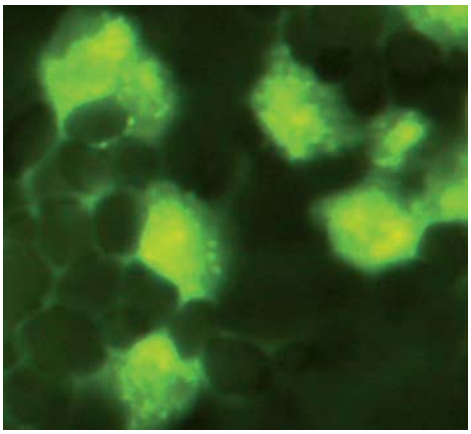


***Рис. 2*. Клетки *T. vaginalis* на фоне *C. albicans*, конъюгат к белку АР65. Контрастирующее вещество родамин (×1000).**

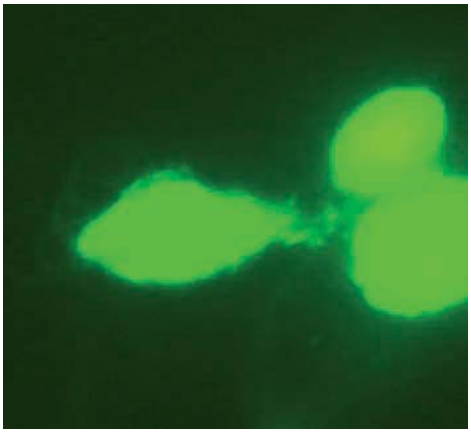


***Рис. 4*. Клетки *T. vaginalis*, конъюгат к лизату клеток (×1000).**

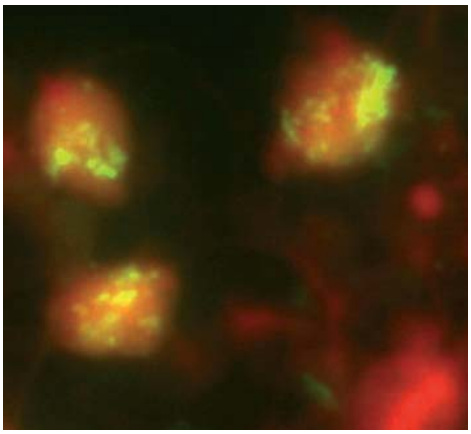


***Рис. 3*. Клетки *T. vaginalis* на фоне сперматозоидов, конъюгат к белку АР65.**

Контрастирующее вещество синька Эванса (×1000).

дальнейшем послужили основой для выделения специфических компонентов тест-системы.

При выделении иммуноглобулинов на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (специфический носитель) получили 4 хроматографические фракции, анализ содержания белка и специфичности в которых показал, что специфические антитела содержались в основном в первой (бессолевой) и второй (0,07 М NaCl) фракциях. Эти фракции использовали для получения ФИТЦ-конъюгатов — специфических антител, меченных флюорохромом (например, ФИТЦ).

При микроскопическом исследовании препаратов, окрашенных полученными ФИТЦ-антителами к лизату клеток *T. vaginalis* и к белку АР65, выявлено специфическое сияющее зеленое свечение на 4 балла клеток трихомонад при концентрации конъюгатов 1000 и 580 мкг/мл соответственно. Использование 0,01% раствора синьки Эванса увеличивает контрастность получаемого изображения и делает результаты микроскопического исследования более однозначными (см. рис. 2, рис. 3). Однако при микроскопии удобнее работать с конъюгатом, который получен на основе суммарного антигена, поскольку он дает свечение всей клетки с хорошо просматриваемыми жгутиками (рис. 4), тогда как при окрашивании конъюгатом к белку АР65 свечение наблюдается на поверхности всей или части клетки в виде гранул (см. рис. 2, рис. 3). Использование смеси полученных конъюгатов в разных соотношениях для окрашивания тех же штаммов позволило получить

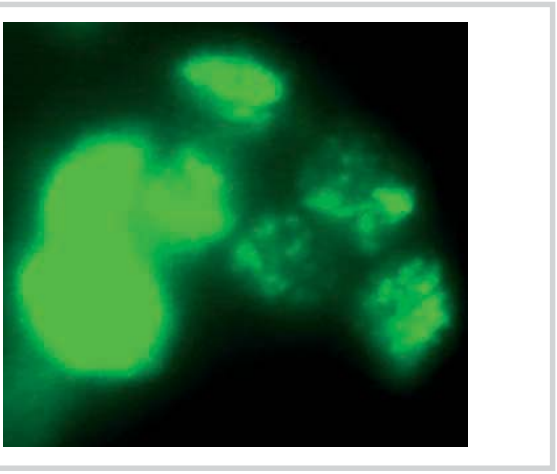


***Рис. 5*. Клетки *T. vaginalis* при окрашивании смесью из двух конъюгатов (×1000).**

следующую картину: часть клеток окрашивались полностью, у остальных свечение наблюдалось только в виде гранул. В связи с этим для дальнейшей работы мы использовали смесь конъюгатов в соотношении по белку 1:1,5 (рис. 5).

Оценивая результаты модельного эксперимента, следует отметить высокую чувствительность метода ПЦР: ДНК *T. vaginalis* была выявлена в пробирке с содержанием даже единичных клеток, что подтверждает данные экспериментов, проведенных ранее [7].

Сравнение предела детекции клеток трихомонад при микроскопическом исследовании нативного, окрашенного неспецифическим красителем и окрашенного ФИТЦ-антителами препаратов показало самую низкую выявляющую способность данного метода. Для всех трех вариантов микроскопии инструментом визуализации результатов является микроскоп, поэтому достоверных различий между тремя этими методиками мы не получили, предел обнаружения — 10^3 клеток трихомонад на 1 мл суспензии (таблица). Помимо низкой чувствительности при микроскопии нативных и неспецифически окрашенных препаратов, существенной проблемой является идентификация простейших, которые потеряли подвижность и изменили морфологию под воздействием разных факторов окружающей среды и для которых в свое время был предложен термин «атипичные трихомонады». Появление таких форм авторы данного исследования связывают с неоптимальными условиями культивирования простейших, отличающихся от привычной среды обитания на поверхности клеток хозяина. Эта проблема становится особенно актуальной при работе с клиническим материалом. Специфическое окрашивание клеток трихомонад с помощью ФИТЦ конъюгированных антител к *T. vaginalis* на фоне клеточных элементов, обязательно присутствующих в клиническом материале (эпителиальные клетки, лейкоциты, клетки сперматогенеза, дрожжеподобные грибы), существенно повысит объективность оценки результатов микроскопии, поэтому метод ПИФ может быть эффективной альтернативой весьма субъективному микроскопическому методу.

При культуральном исследовании было достаточно 10^2 клеток трихомонад для начала культивирования на питательной среде СВТ. Однако и в случае культурального метода на фоне подвижных типичных клеток встречаются и неподвижные клетки округлой формы. При малой посевной дозе такие формы могут составлять значительную долю клеток. Микроскопическое исследование с использованием светового микроскопа не позволяет однозначно идентифицировать эту форму как *T. vaginalis*, поэтому использование ПИФ для окраски препаратов после культивирования позволит избежать ошибочного диагноза. Применение разработанного нами метода ПИФ как объективного способа идентификации *T. vaginalis* позволит значительно повысить эффективность культурального исследования.

Выводы

В результате исследования получен ФИТЦ-конъюгат для выявления *T. vaginalis* методом ПИФ на основе смеси антител к *T. vaginalis* и белку AP65 в соотношении по белку 1:1,5 соответственно. В предварительных модельных испытаниях препарата показана возможность его использования для выявления *T. vaginalis* при наличии в исходном материале минимум 10^3 клеток простейших. Исходя из наших данных, использование метода ПИФ наиболее це-

Сравнительная оценка чувствительности методов выявления при разном содержании клеток *T. vaginalis* (n=3)

Содержание, кл/мл	Нативный препарат	Окрашенный препарат	Культуральное исследование	РИФ	ПЦР
10^6	46±6 в каждом п/зр	>200 в каждом п/зр	–	>200 в каждом п/зр	+
10^5	4±1 в каждом п/зр	12±2 в каждом п/зр	>200 в каждом п/зр	17±4 в каждом п/зр	+
10^4	2±1 из 10 п/зр	1±1 из 10 п/зр	>200 в каждом п/зр	2±1 из 10 п/зр	+
10^3	3±1 в 100 п/зр	5±1 в 100 п/зр	6±1 в 100 п/зр	2±1 в 100 п/зр	+
10^2	0	0	1±1 в 100 п/зр	0	+
10 и менее	0	0	0	0	+

Примечание. п/зр — поле зрения.

лесообразно для идентификации трихомонад в среде культивирования при культуральном исследовании при наличии неподвижных клеток, имеющих некоторые морфологические отличия от *T. vaginalis*.

Работа стала победителем конкурса грантов 2010 г. для студентов, аспирантов ВУЗов и академических институтов (расположенных на территории Санкт-Петербурга).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кубанова А.А., Лесная И.Н., Кубанов А.А. и др.* Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации. Вестн дерматол и венерол 2010; 5: 4—21.
2. *Теличко И.Н., Иванов А.М., Раздольская Н.В. и др.* Перспективы серологической диагностики трихомониаза. Мед иммунол 2007; 9: 2—3: 249—250.
3. *Krieger J.N., Tam M.R., Stevens C.E. et al.* Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. JAMA 1988; 259: 8: 1223—1227.
4. *Smith R.F.* Detection of Trichomonas vaginalis in vaginal specimens by direct immunofluorescence assay. J Clin Microbiol 1986; 24: 6: 1107—1108.
5. *Mundodi V., Kucknoor A.S., Klumpp D.J. et al.* Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by Trichomonas vaginalis. J Mol Microbiol 2004; 53: 4: 1099—1108.
6. *Roederer M.* Conjugation of monoclonal antibodies. August, 2004. http://www.drmr.com/abcon/
7. *Рыжих П.Г., Гущин А.Е., Савочкина Ю.А.* Сравнительная оценка аналитической чувствительности методов микроскопии (нативного и окрашенного препаратов) и амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР и НАСБА в реальном времени) при обнаружении *Trichomonas vaginalis*. Клин дерматол и венерол 2011; 2: 25—31.