

**Задора И.С.¹, Жаворонок С.В.¹,
Алаторцева Г.И.², Притворова Л.Н.²,
Нестеренко Л.Н.²
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
ЛОВУШЕЧНЫМ МЕТОДОМ ДЛЯ
ДЕТЕКЦИИ АНТИТЕЛ КЛАССА М
К ВИРУСУ ГЕПАТА Е**

¹УО «Белорусский государственный
медицинский университет», г. Минск, Беларусь
²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
г. Москва, Россия

Введение. Вирус гепатита Е человека является представителем рода *Paslahepevirus*, вид *Paslahepevirus balayani*. Геном вируса содержит 6,4-7,2 т.п.н. кэпированную линейную одноцепочечную РНК с позитивной полярностью и тремя белками ORF, при этом неструктурные белки кодируются ближе к 5'-концу генома, а структурные - к 3'-концу. Дополнительная ORF4, перекрывающая начало ORF1, обнаружена у штаммов, принадлежащих к виду *Orthohepevirus ratti* (1 генотип ВГЕ) [1]. Всего выделяют 1 серотип и 8 генотипов вируса [2, 3].

ВГЕ имеет уникальный цикл репродукции. При реализации фекально-орального механизма передачи вирус сначала попадает в организм хозяина через желудочно-кишечный тракт и реплицируется в эпителиальных клетках кишечника. Впоследствии вирус попадает в кровоток и достигает органа-мишени – печень [4]. Прикрепление вируса происходит за счет связывания с гепарансульфат-протеогликанами (HSPG) [5]. После проникновения вируса внутрь клетки и депротенинизации, область ORF1 транслируется в полипротеин, используя положительную цепь в качестве матрицы [6]. Вирусная репликаза синтезирует комплементарную РНК с отрицательным смыслом, которая служит матрицей для репликации ВГЕ и транскрипции субгеномной сгРНК, которая отвечает за трансляцию белков ORF2 и ORF3 [7-9]. Секретируемая форма ORF2 подвергается посттрансляционным модификациям и действует как иммунная ловушка, тогда как ассоциированная с капсидом форма ORF2 собирается в вирусоподобные частицы и упаковывает геномную РНК в потомство вирионов HEV [10]. Белок ORF3 взаимодействует с микротрубочками и множеством клеточных белков хозяина, способствуя репликации и отпочкованию возникающих вирионов в мультивезикулярные

тельца [11]. Мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной, вирионы высвобождаются из клеток печени либо в кровоток, обернутые липидной мембраной, либо в желчные протоки, где квазиоболочка разрушается солями желчных кислот [12].

Вирионы, секретируемые с фекалиями, представляют собой безоболочечные сферические частицы диаметром примерно 27–34 нм, обладают большей инфекционностью. Однако вирионы, секретируемые в циркулирующую кровь и супернатант инфицированных культур клеток, являются квазиоболочечными, покрытыми липидной оболочкой, устойчивыми к нейтрализации антителами против капсидного белка вируса [13, 14].

Диагностика вирусного гепатита Е (ВГЕ) проводится на основании клинических, эпидемиологических и лабораторных данных. Ввиду схожести клинических проявлений, особенно важна лабораторная диагностика, позволяющая дифференцировать вирусную этиологию инфекционных заболеваний. Клиническое течение ВГЕ-инфекции различается: вирус 1 и 2 генотипов часто вызывает острое заболевание, может привести к острой печеночной недостаточности (ОПН) или острой печеночной недостаточности, развившейся на фоне хронической, с высокой летальностью беременных до 20%. При этом большинство ВГЕ-инфекций 3 и 4 генотипов имеют клинически бессимптомное течение, изредка приводят к ОПН у пожилых людей или пациентов с сопутствующим заболеванием печени. Известны случаи хронизации гепатита Е, вызванного 3-м и 4-м генотипом вируса, у пациентов с трансплантированными паренхиматозными органами, у лиц, получающих химиотерапию, гематологических пациентов и пациентов с ревматоидной патологией, что затем может привести к опасному для жизни циррозу печени [16, 17]

Лабораторная верификация острого вирусного гепатита Е основывается на выявлении специфических маркеров: антител классов IgM и IgG, а также вирусной РНК. Эти исследования проводятся в биологическом материале, таком как фекалии, желчь и сыворотка крови, с применением серологических и молекулярно-генетических методов. Серологические методы исследования обладают рядом преимуществ, включая высокую доступность, специфичность и чувствительность, а также относительную простоту выполнения. Эти характеристики обеспечивают быстрое и точное установление диагноза, что, в свою оче-

редь, предотвращает дальнейшее распространение инфекции.

Ранее уже были представлены наши работы по разработке и выпуску отечественных наборов «ИФА-анти-ВГЕ IgM» [17]. В качестве альтернативного варианта диагностическому набору «ИФА-анти-ВГЕ IgM», для выявления иммуноглобулинов класса М в сыворотке крови человека была разработана тест-система, основанная на ловушечном методе иммуноферментного анализа. В отличие от классического непрямого варианта иммуноферментного анализа, в данном случае для сенсibilизации планшета наносят очищенные антитела к иммуноглобулинам человека класса М с последующей инкубацией с исследуемой сывороткой. В результате все IgM связываются с иммуносорбентом, а наличие специфических иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е выявляется с помощью рекомбинантного полипептида ORF2 3-го генотипа ВГЕ, конъюгированного с ферментом.

Цель исследования – разработка иммуноферментной тест-системы, основанной на ловушечном методе, для выявления иммуноглобулинов класса М в сыворотке крови людей.

Материал и методы. Антитела к иммуноглобулинам класса М человека (FineTest) разводились в карбонатно-бикарбонатном буфере и наносились на 96-луночные разборные полистирольные планшеты (Хема, РФ). Для сорбции антител планшеты инкубировались в течение 16-18 ч при температуре +2...+8°C, после этого раствор удалялся из всех лунок автоматической аспирацией. Планшеты сенсibilизировали в разные дни, ИФА проводили несколько раз. Образцы сывороток крови людей в процессе постановки анализа разводили 1:10. В качестве конъюгата использовался рекомбинантный полипептид ORF2 3-го генотипа ВГЕ, связанный с ферментом.

Результаты исследования. Этапы конструирования иммуноферментной тест-системы для определения анти-ВГЕ IgM ловушечным методом у людей являлись: подбор оптимальной концентрации антител к иммуноглобулинам класса М человека для получения иммуносорбента; подбор рабочего разведения конъюгата; подбор оптимального времени инкубации с ТМБ и отработка метода учета реакции; определение основных валидационных характеристик разработанной тест-системы.

Для выбора ориентировочных диапазонов рекомендуемых концентраций для сорбции белки

разводились в 0,05М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 8,5) до 8 мг/л и последовательно разводились в 2 раза до концентраций 4, 2, 1, 0,05 мг/л. В результате исследования были получены достоверные различия значений ОП положительных и отрицательных контрольных смесей при анализе всех сорбированных концентраций анти-IgM ($p < 0,001$) для определения иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е.

Разведение 1 мг/л мышинных антител к иммуноглобулинам класса М человека установлено как наиболее оптимальное для создания иммуносорбента для определения IgM к вирусу гепатита Е (рис. 1).

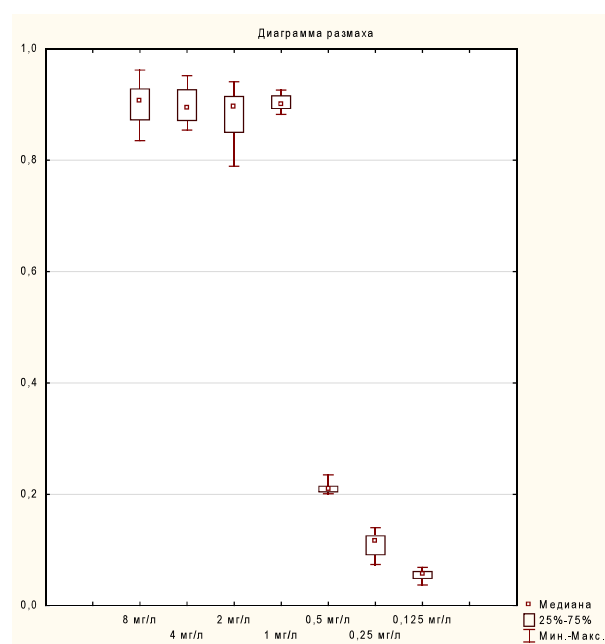


Рисунок 1 – Диаграмма размаха показателей ОП сывороток крови с анти-ВГЕ IgM в зависимости от наносимых концентраций МКАТ

После подбора оптимальных условий для создания иммуносорбента, основанного на ловушечном методе, следующим этапам было определение ориентировочного диапазона разведения рекомбинантного полипептида ORF2 3 генотипа ВГЕ, меченного пероксидазой хрена. ORF2 – ПХ разводили до значений от 1:1 000 до 1:128 000 в специальном растворе, приготовленном на основании аналитического буферного раствора и стабилизирующего раствора, для блокирования неспецифического взаимодействия. ИФА проводился в повторях с использованием положительных и отрицательной сывороток (рис. 2). Время инкубации конъюгата – 30 минут. Критерием вы-

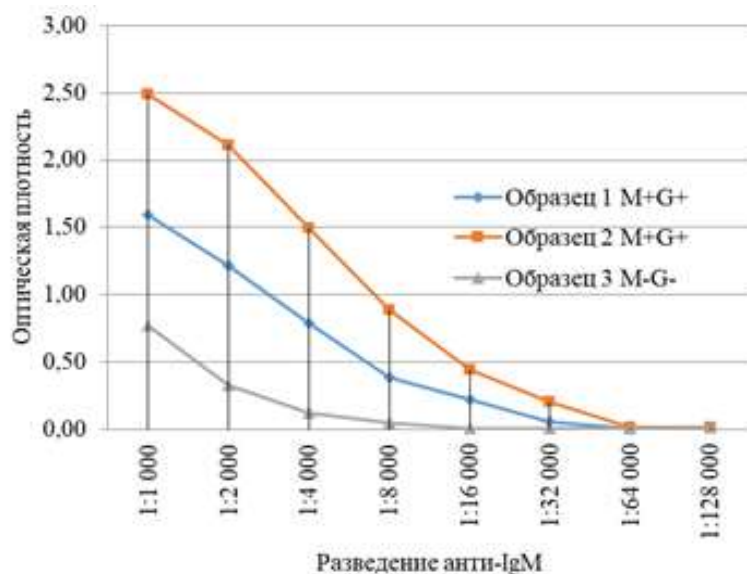


Рисунок 2 – Медианные показатели ОП образцов сывороток крови людей при титровании конъюгата ORF2-ПХ

бора разведения конъюгата для детекции маркеров острого вирусного процесса ловушечным методом ИФА является способность связывать максимальное количество иммуноглобулинов класса М при минимальном фоновом показателе.

В результате сравнительного анализа показателей ОП положительных и отрицательных образцов сывороток крови людей при титровании ORF2-ПХ установлен оптимум разведения конъюгата 1:4 000 при минимальных показателях фона.

Далее необходимо было определить время инкубации с ТМБ. Для этого использовались позитивная и негативная по анти-ВГЕ-IgM сыворотки крови людей при времени инкубации с ТМБ 5, 10, 15, 20, 25 минут. Такие параметры, как наносимая на планшеты концентрация анти-IgM антител (1 мг/л) и титр разведения конъюгата ORF2-ПХ (1:4000), не изменялись. Критерием выбора являлось достижение максимального показателя коэффициента позитивности. КП достигал максимального значения (63,600) при инкубации с ТМБ в течение 20 минут, соответственно это время и было определено как наиболее оптимальное при детекции антител класса М к вирусу гепатита Е ловушечным методом.

Для оценки аналитических свойств разработанной тест-системы ИФА для определения антител класса М в сыворотке (плазме) крови человека ловушечным методом, проведен сравнительный анализ разработанной тест-системы с референсным коммерческим набором «ИФА-АНТИ-HEV-IgM» (НПО «Диагностические си-

стемы», РФ). Для этого исследовались образцы 37 позитивных и негативных сывороток крови людей, входящих в контрольную панель. По результатам ROC-анализа автоматически была установлена точка отсечения (cut-off) 0,155 (рис. 3). Площадь под кривой (AUC) составила 0,987 (95% ДИ 0,957 – 1,017, $p < 0,001$). Специфичность теста, представляющая отношение истинно отрицательных к числу фактически отрицательных случаев, составила 100%, точность теста 97%, чувствительность, согласно отношению истинно положительных к числу фактически положитель-

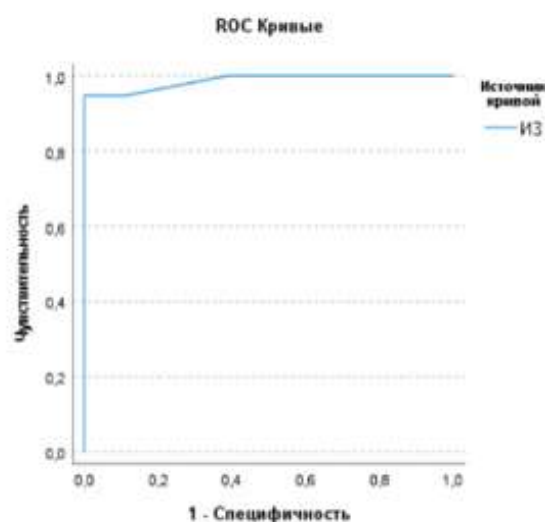


Рисунок 3 – ROC- кривая для оценки сконструированного набора ИФА для детекции анти-ВГЕ IgM ловушечным методом

ных случаев, равна 95%. Положительная прогностическая значимость 100%, отрицательная прогностическая значимость 95%, отношение шансов (ОШ) – 19 (95% ДИ 5,6 – 24,0, $p < 0,001$), значение теста Каппа-Коэна 0,946 (95% ДИ 0,826 – 1,000, $p < 0,001$), что соответствует сильной связи с эталонными тестами.

Данные показатели указывают на высокую диагностическую надёжность разработанного набора ИФА ловушечным методом для детекции антител класса М к вирусу гепатита Е. Однако, стоит отметить, что отечественный диагностический набор «ИФА-анти-ВГЕ IgM» обладает более высокой чувствительностью – не менее 99% при детекции IgM на контрольной панели сывороток, непрямой метод ИФА более технологичен, тогда как ловушечный вариант определения антител класса М к вирусу гепатита Е представляет научный интерес.

Заключение. Установлен оптимум разведения антител к иммуноглобулинам класса М человека для создания иммуносорбента – 1,0 мг/л. Оптимум разведения специфического конъюгата ORF2 3-го генотипа ВГЕ, меченого пероксидазой хрена, составил 1:4 000, время инкубации с ТМБ – 20 мин. Специфичность теста, представляющая отношение истинно отрицательных к числу фактически отрицательных случаев, составила 100%, точность теста 97%, чувствительность, согласно отношению истинно положительных к числу фактически положительных случаев, равна 95%.

Список литературы:

1. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, German / John R., Heckel G., Plenge-Bönig A., Kindler E., Maresch C., Reetz J., Schielke A., Ulrich R.G. // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – Vol. 16. № 9. – P. 1452-1455. doi: 10.3201/eid1609.100444.
2. Avian Hepatitis E Virus: With the Trend of Genotypes and Host Expansion / Sun P., Lin S., He S., Zhou E.M., Zhao Q. // *Front Microbiol.* – 2019. – Vol. 2, № 10. – P. 1696. doi: 10.3389/fmicb.2019.01696.
3. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A / Smith D.B., Izopet J., Nicot F., Simmonds P., Jameel S., Meng X.J., Norder H., Okamoto H., [et al.] // *J Gen Virol.* – 2020. – Vol. 101, № 7. – P. 692-698. doi: 10.1099/jgv.0.001435.
4. Disorder and sequence repeats in hub proteins and their implications for network evolution / Z. Dosztanyi, J. Chen, A.K. Dunker, I. Simon, P. Tompa // *J Proteome Res.* – 2006. – Vol. 5. №11. – P. 2985–2995.
5. The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of hepatitis E virus are important for enhanced virus replication / S.P. Kenney, M. Xiang-Jin. – *J Virol.* – 2015. – № 89. – P. 3793.
6. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis / Varma S.P., Kumar A., Kapur N., Durgapal H., Acharya S.K., Panda S.K. // – *J. Gen. Virol.* – 2011. – № 92. – P. 572–581. doi: 10.1099/vir.0.027714-0.
7. A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus / Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S.U. // *J. Virol.* – 2006. – № 80. – P. 5919–5926. doi: 10.1128/JVI.00046-06.
8. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles / Ding Q., Heller B., Capuccino J.M.V., Song B., Nimgaonkar I., Hrebikova G., Contreras J.E., Ploss A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2017. – № 114. – P. 1147–1152. doi: 10.1073/pnas.1614955114.
9. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins / Jameel S., Zafrullah M., Ozdener M.H., Panda S.K. // *J. Virol.* – 1996. – № 70. – P.207–216.
10. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection / Yin X., Ying D., Lhomme S., Tang Z., Walker C.M., Xia N., [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018 - № 115. - P. 4773-4778.
11. Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion / Gouttenoire J., Pollan A., Abrami L., Oechslin N., Mauron J., Matter M., [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2018. - № 14.- e1007471.
12. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway / Nagashima S. [et al.] // *Journal of virology.* – 2017. – T. 91. – №. 22. – C. 10.1128/jvi. 00822-17.
13. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces / Takahashi M., Yamada K., Hoshino Y., Takahashi H., Ichiyama K., Tanaka T., [et al.] // *Arch Virol.* – 2008. - Vol. 153, № 9. – P. 1703–1713.
14. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response / Chapuy-Regaud S., Dubois M., Plisson-Chastang C., Bonnefois T., Lhomme S., Bertrand-Michel J., [et al.] // *Biochimie.* – 2017. – № 141. – P. 70-79.
15. Evidence of extrahepatic sites of replication of

the hepatitis E virus in a swine model / Williams T.P., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., [et al] // J Clin Microbiol. – 2001. – № 39. – P. 3040-3046.

16. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection / Kalia M., Chandra V., Rahman S.A., Sehgal D., Jameel S. // J Virol. – 2009. – № 83. – P.12714-12724.

17. Разработка и оценка иммуноферментной тест-системы для диагностики острого вирусного гепатита E / Задора И.С., Жаворонок С.В., Алаторцева Г.И., Щербань А.И., Притворова Л.Н., Нестеренко Л.Н., Давыдов В.В., Анисько Л.А., Рогачева Т.А., Баюр Н.Г., Щука Н.В., Мытько Ю.А., Смирский В.В., Михайлов М.И., Зверев В.В. // Проблемы здоровья и экологии. – 2025. – Т. 23, № 2. – С.35-45.

**Иванова А.А., Семёнов В.М., Зенькова С.К.
ПРЕДСТАВИТЕЛИ ВИРОМА ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ, ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ВОИНСКИХ
КОЛЛЕКТИВОВ**

*УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Беларусь*

Неврологические заболевания являются одной из главных причин инвалидности и летальности во всем мире [1]. С 1990 г. совокупное бремя обусловленной ими инвалидности, заболеваемости и преждевременной смертности выросло на 18% [1]. Поражения нервной системы разнообразны и частота их встречаемости зависит от конкретного диагноза. По данным статистики, инфекционные поражения центральной нервной системы (ЦНС) достигают 40% в структуре неврологической патологии человека [2]. Раннее выявление этиологического агента, своевременное начало адекватной терапии позволяют снизить уровень инвалидизации и смертности и улучшить прогноз данных заболеваний. Однако, несмотря на наличие современных лабораторных методов диагностики, до 35-55% нейроинфекций остаются неverified [3]. Кроме того, в последние годы появилось понятие «вирус человека». Вирус человека характеризуется удивительной таксономической и генетической сложностью [4]. Он включает вирусы, инфицирующие эукариотные клетки; бактериофаги; фаги, заражающие археи; профаги; эндогенные ретрови-

русы и вирусные элементы, встроенные в геном человека [4]. Состав вирома активно изучается и постоянно пополняется. Представителем вирома человека является и Torque Teno вирус (TTV), обнаруженный практически во всех жидкостях и тканях человека. В течение длительного времени исследователи занимаются изучением влияния богатого спектра представителей человеческого вирома на развитие патологического процесса в макроорганизме, в том числе и инфекций ЦНС. Однако роль большинства вирусов в патогенезе конкретных заболеваний остается до конца неясной, что подчеркивает необходимость проведения дополнительных исследований.

Цель исследования – оценить наличие и уровень ДНК TTV в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у пациентов с патологией ЦНС различной этиологии и у практически здоровых людей, в том числе у лиц призывного возраста (с 18 по 27 лет).

Материал и методы. В исследование было включено 148 пациентов с патологией ЦНС, 20 из которых составили группу пациентов с инфекционными поражениями ЦНС (менингиты, энцефалиты, менингоэнцефалиты) бактериальной этиологии, 67 пациентов – с вирусными поражениями, 61 пациент – с патологией ЦНС неинфекционной этиологии. Группу контроля составили 70 пациентов без поражения центральной нервной системы. Люмбальная пункция у этих пациентов проводилась в связи с наличием лихорадки и симптомов внутричерепной гипертензии (головная боль, тошнота, рвота). Средний возраст обследованных составил 33,1 года (min – 6 дней, max – 91 г.), представителями женского пола были 103 человека (47,2%), мужского – 115 (52,8%). Среди пациентов, включенных в исследование, 33 были призывного возраста: 12 – с инфекциями ЦНС вирусной этиологии, 1 – с бактериальным менингитом неуточненной этиологии, 6 пациентов – с патологией ЦНС неинфекционной этиологии и 14 пациентов – без патологии ЦНС. У всех пациентов забор ликвора выполнялся на 1-6 сутки госпитализации, 38 пациентов были обследованы повторно. В целом было протестировано 287 образцов ЦСЖ. Обнаружение и количественное определение ДНК TTV в ЦСЖ осуществлялось методом ПЦР в режиме реального времени разработанной нами методикой [5].

Результаты исследования. ДНК TTV была обнаружена в ЦСЖ у 60 обследованных пациентов, что составило 27,5%. Среди этих пациентов 20 были из группы с вирусными поражениями ЦНС, 16 – из группы с бактериальной этиологией