

## **РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G К ВИРУСУ ГЕПАТИТА E**

*Жаворонок С. В.<sup>1</sup>, Задора И. С.<sup>1</sup>, Давыдов В. В.<sup>1</sup>, Анисько Л. А.<sup>2</sup>, Рогачева Т. А.<sup>2</sup>,  
Алаторцева Г. И.<sup>3</sup>, Лухверчик Л. Н.<sup>3</sup>, Нестеренко Л. Н.<sup>3</sup>, Смирский В. В.<sup>4</sup>,  
Щербань А. И.<sup>4</sup>, Щука Н. В.<sup>4</sup>, Мытько Ю. А.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup> Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»,  
г. Москва, Российская Федерация;

<sup>4</sup> Унитарное предприятие «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** При изучении интенсивности распространения вируса гепатита E (ВГЕ) на территории Республики Беларусь установлено, что риск встречи с возбудителем данной инфекции возрастает в зависимости от возраста населения, при этом преобладают стертые безжелтушные формы, что в значительной мере затрудняет дифференциальную диагностику и потенциально может приводить к распространению инфекции и повышению частоты встречаемости с вирусом [1].

В настоящее время в Беларуси отсутствует национальная тест-система иммуноферментного анализа (ИФА) для качественного определения антител IgG к ВГЕ в сыворотке крови людей. Несмотря на наличие зарубежных аналогов, разработка, производство и внедрение в практическую

деятельность собственной системы ИФА для серологической диагностики имеет также социальную и экономическую значимость.

**Ключевые слова:** ВГЕ, ИФА, IgG, ORF2, ORF3, 3 генотип.

**Введение.** Возбудителем гепатита Е (ГЕ) является простой одноцепочечный +РНК-вирус (ВГЕ), который относится к семейству *Hepeviridae* роду *Orthohepevirus*. Род *Orthohepevirus* был разделен на четыре вида *Orthohepevirus A-D*, поражающих всех млекопитающих и птиц. На сегодняшний день идентифицировано восемь основных генотипов ВГЕ, из которых генотипы 1–4 и 7 инфицируют человека. При этом генотипы 1 и 2 циркулируют только среди людей, генотипы 3 и 4, являясь возбудителями зооантропонозов, выделяются у свиней, кроликов и других видов животных и вызывают ГЕ в развитых странах. ВГЕ 7 генотипа был выделен у верблюдов, также известны случаи хронического ГЕ, вызванного данным генотипом вируса [2, 3]. На территориях Европы и Азии чаще всего регистрируются 1-й и 3-й генотипы вируса, причем ВГЕ 3-го генотипа доминирует и может вызывать спорадические случаи заболевания повсеместно [4]. Известны также случаи хронической формы ГЕ, вызванного ВГЕ 3-го генотипа, у пациентов с трансплантацией печени и почек, лиц с ослабленным иммунитетом, ВИЧ-инфицированных пациентов, гематологических пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов с ревматоидной патологией [5].

Геном ВГЕ содержит три открытые рамки считывания (*orf*). Ген *orf1* кодирует неструктурный полипротеин, состоящий из метилтрансферазы, папаиноподобной цистеиновой протеазы, РНК-хеликазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы. Ген *orf2* кодирует белок вирусного капсида, являющийся доминантным антигеном и участвующий в сборке вириона и взаимодействии с клеткой-хозяином. Он содержит три сайта гликозилирования, необходимых для образования инфекционных частиц. Ген *orf3* является самой маленькой частью генома ВГЕ, кодирующий белок из 113–115 аминокислот. Данный полипептид не оказывает существенного влияния на репликацию РНК ВГЕ, сборку вируса, однако необходим для высвобождения вирусных частиц [2, 6].

Лабораторная верификация диагноза ВГЕ основывается на обнаружении IgM- и/или IgG-антител, а также вирусной РНК в фекалиях и сыворотке пациентов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом серологические методы исследования отличаются своей доступностью, высокой специфичностью

и чувствительностью, относительной простотой выполнения, что способствует оперативному установлению точного диагноза и предупреждает последующую передачу инфекции другим людям.

Определение маркеров ВГЕ с помощью тест-системы ИФА у групп риска (беременные, доноры, лица с острой и хронической патологией печени, охотники, ветеринары, иностранные граждане, особенно прибывшие из эндемичных по ГЕ регионов), а также внедрение системы противоэпидемических мероприятий помогут предупредить дальнейшее распространение возбудителя и развитие инфекции.

**Цель работы** — разработка тест-системы иммуноферментного анализа для качественного определения антител класса G к ВГЕ в сыворотке крови человека.

**Материалы и методы.** Научно-исследовательская работа по этому вопросу выполнена в рамках финансируемого проекта «Разработать медико-технические требования к иммуноферментным тест-системам для определения антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита Е у человека. Создать контрольные панели сывороток крови человека, содержащих антитела к вирусу гепатита Е», выполняемой в ходе мероприятия 13 «Разработать технологию промышленного изготовления тест-систем для выявления антител IgG и IgM-классов к вирусу гепатита Е у человека и животных с использованием иммуноферментного метода анализа и организовать их производство» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Научеомкие технологии и техника» на 2021–2025 годы.

ИФА тест-система для качественного определения анти-ВГЕ IgG основана на твердофазном непрямом варианте иммуноферментного анализа с применением рекомбинантных антигенов ВГЕ. На поверхности 96-луночных разборных полистирольных планшетов (Microplate, breakable, high sorb, кат. № N001, Lot.: D8-58-05 фирма Хема, Россия) в различных комбинациях, в смеси и по отдельности иммобилизовали рекомбинантные антигены — аналоги белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа (ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Россия) [4, 7], внося по 100 мкл в каждую лунку. После инкубации под защитной пленкой в течение 16–18 ч при температуре +2...+8 °С лунки промывали 5 раз

на автоматическом аппарате BioSan Intelispeed Washer IW8.

В последующем для стабилизации иммобилизованных антигенов проводилась обработка твердофазного носителя постпокрывающим раствором, включающим инертный белок, дисахарид, ингибитор протеиназ и бактериостатик, разработанном и предоставленном УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», наносимом в объеме 150 мкл/лунка с помощью автоматического дозатора Multipette M4 — Multi-Dispenser Pipette (Eppendorf, Германия). Обработка постпокрывающим раствором проводилась в течение 16–18 ч при температуре +2...+8 °С. После окончания инкубации раствор удаляли из всех лунок аспирацией, затем планшеты высушивали в течение 16–18 ч при температуре +20...+25 °С в ламинарном шкафу на листе фильтровальной бумаги вверх дном под углом. Сенсибилизированные планшеты помещали в фольгированную индивидуальную упаковку и хранили в холодильнике при температуре +2...+8 °С в течение различного времени для последующей оценки стабильности работы иммуносорбента.

Для проверки работы экспериментального варианта тест-системы была создана база данных основной группы пациентов разных возрастов, имевших повышенную активность в сыворотке (плазме) крови гепатотропных ферментов (АлАТ более 100 МЕ/мл) и IgM или IgG к ВГЕ; практически здоровых людей разных возрастов, имеющих в сыворотке (плазме) крови IgG к ВГЕ. В контрольную группу были включены пациенты, не имевшие в сыворотке (плазме) крови антител IgM и/или IgG к ВГЕ. Биологический материал получали от доноров, пациентов отделений городской клинической инфекционной больницы, лиц с хроническими вирусными гепатитами консультативно-диагностического кабинета (КДК), а также из других учреждений здравоохранения г. Минска (3-я ГКБ, 5-я ГКБ и др.), образцы хранились при температуре не выше –20 °С. Все исследуемые пробы прошли предварительные испытания на наличие либо отсутствие IgM и/или IgG с помощью референс тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Российская Федерация) согласно инструкции производителя.

Схема проведения ИФА включала в себя несколько этапов. Каждая постановка сопровождалась внесением по 100 мкл/лунка положительного и отрицательного контрольных образцов референс — набора реагентов

«ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», Российская Федерация). Образцы исследуемых сывороток разводились 1:10 и вносились с помощью одноразовых накопечников в лунки. Планшет закрывался защитной пленкой и помещался на инкубацию в термостат на 30 мин при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °С для последующего связывания иммуноглобулинов класса G к ВГЕ с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными полипептидами ORF2 и/или ORF3.

После инкубации планшет автоматически промывали 5 раз рабочим промывочным раствором на аппарате BioSan Intelispeed Washer IW8. Остатки промывочного раствора удаляли из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Затем во все лунки с помощью многоканального дозатора вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата из набора для иммуноферментного анализа «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G». Планшет закрывали и выдерживали в термостате 30 мин при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °С для специфического взаимодействия связавшихся анти-ВГЕ IgG с моноклональными антителами против иммуноглобулинов класса G человека, меченных пероксидазой хрена.

Затем следовал этап пятикратной промывки для удаления избытка несвязавшегося конъюгата, остатки промывочного раствора удаляли из лунок постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге. Во все лунки вносили по 100 мкл субстратного буферного раствора с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ), стрипы инкубировали 15 мин в темноте при температуре 18–25 °С. Для остановки реакции во все лунки добавляли по 50 мкл 0,75 М раствора серной кислоты (стоп-реагент). Учет результатов проводили на универсальном спектрофотометре «Витязь» Ф300 при длине волны 450 нм и референс-светофилт্রে 620–680 нм. Реакцию учитывали, если оптическая плотность положительного контроля составляла более 0,6, а среднее значение оптических плотностей отрицательных контролей — менее 0,2 согласно инструкции «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ).

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакетов статистического анализа данных Statistica for Windows 10.0 и программы анализа данных Microsoft Excel пакета Microsoft Office операционной системы Windows 10.0.

**Результаты и их обсуждение.** Для создания сенсибилизированного планшета осуществлял-

ся подбор оптимальной концентрации для каждого рекомбинантного антигена ВГЕ ORF2 и ORF3 3-го генотипа отдельно и совместно методом квадратно-гнездового титрования (рисунок). Для этих целей готовили разведение белков в концентрациях от 2,5 до 0,25 мкг/мл в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) pH 9,5–9,6.

На основании проведенных исследований установлено, что рекомбинантный полипептид ORF2 является основным антигеном для сенсibilизации твердофазного носителя в оптимальной концентрации 2,5 мкг/мл, а рекомбинантный полипептид ORF3 в концентрации 0,25 мкг/мл способствует дополнительному связыванию анти-ВГЕ IgG, обеспечивая максимальную емкость иммуносорбента. Использование относительно небольшой концентрации антигена ORF3 обусловлено тем, что данный белок

вызывает преимущественно образование IgM- и ранних IgG-антител, а разработанная тест-система направлена на качественную оценку содержания IgG-антител к ВГЕ. При сравнительной оценке работы иммуносорбентов ORF2 и ORF3 в концентрациях 2,5 и 0,25; 1 и 0,25 мкг/мл в пределах одного сенсibilизированного планшета выявлено, что в целях предупреждения неспецифического связывания наиболее целесообразно использование комбинации 2,5 и 0,25 мкг/мл.

Для оценки работы разработанной тест-системы ИФА в параллели с референсной тест-системой исследовались положительные и отрицательные по содержанию IgG к ВГЕ пробы сывороток, а также положительный контроль из набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ) (таблица 1).

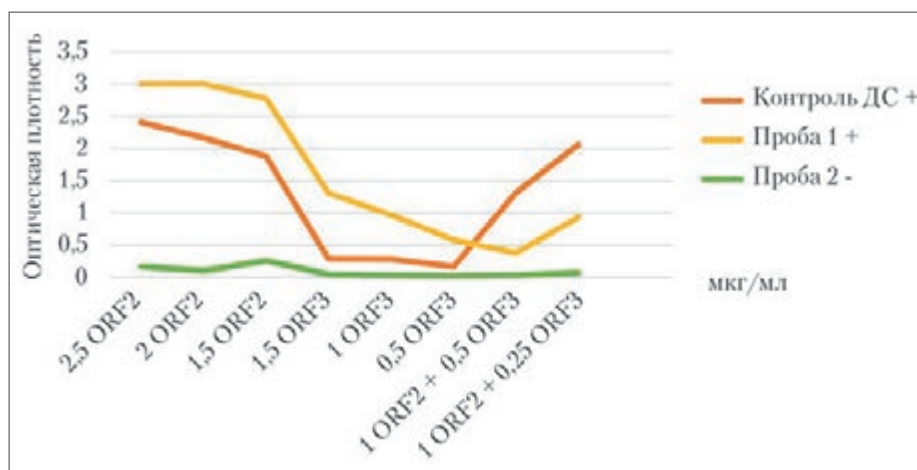


Рисунок — Пример результата определения оптической плотности положительного контроля положительной пробы № 1 и отрицательной пробы № 2 сывороток пациентов

Таблица 1 — Оценка антигенной специфичности рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ по сравнению с референсной тест-системой методом ИФА

Номер планшета/ исследуемая группа		Количество образцов	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП <sub>СРЕД.</sub> (M $\pm$ m)	
			Имуносорбент ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа	Референс-набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G»
Планшет 1	Смесь отрицательных сывороток	40	0,011 $\pm$ 0,010	0,009 $\pm$ 0,006
	Больные ГЕ и реконвалесценты (в повторях)	2	0,822 $\pm$ 0,208	0,775 $\pm$ 0,194
Планшет 2	Здоровые доноры	42	0,013 $\pm$ 0,010	0,010 $\pm$ 0,004
	Больные ГЕ и реконвалесценты	7	1,333 $\pm$ 0,308	1,144 $\pm$ 0,185
	Положительный контроль (НПО, ДС)	17	1,308 $\pm$ 0,070	1,149 $\pm$ 0,077

Обращают на себя внимание более высокие значения оптической плотности при анализе образцов, проведенном с помощью разработанной тест-системы, по сравнению с набором реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», что позволяет надеяться на перспективность применения использованных в данной работе рекомбинантных антигенов для повышения аналитической чувствительности тест-систем.

Сравнительный анализ первоначальных результатов ИФА сенсibilизированных планшетов и референсной тест-системы показывал отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что свидетельствовало о высокой диагностической значимости полученных результатов.

Критическое значение оптической плотности ( $OP_{\text{крит}}$ ) для разделения отрицательных и положительных результатов определялось как сумма среднего значения оптических плотностей отрицательного контроля и коэффициента 0,2.

Также для предупреждения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов был рассчитан интервал значений ОП, входящих в неопределенную или сомнительную область (серая зона). Положительными считались образцы, значения оптических плотностей которых были равными или превышали « $OP_{\text{крит}} + 10\%$ », отрицательными считались образцы сывороток крови человека, если значение ОП исследуемого образца было меньше значения « $OP_{\text{крит}} - 20\%$ ». Если результат качественного анализа находился в области неопределенных значений, то данная проба сыворотки переставля-

лась повторно на другом планшете, сенсibilизированном с той же концентрацией антигенных полипептидов.

Для оценки относительной специфичности и относительной чувствительности разработанной тест-системы ИФА для качественной оценки антител IgG к ВГЕ проводили сравнение результатов, полученных с применением данной тест-системы и референсного набора для иммуноферментного анализа «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», Российская Федерация) с применением таблицы сопряженности «2x2», в которой наглядно представлены результаты 233 исследований проб сывороток крови и положительных контролей с помощью двух тест-систем в нескольких повторах (таблица 2).

При увеличении количества выборки было получено 3 ложноположительных образца, ложноотрицательные результаты отсутствовали. Таким образом, рассчитанная с помощью матрицы сопряженности относительная чувствительность разработанной тест-системы составила не менее 99 %, относительная специфичность разработанной тест-системы составила 96 %. В настоящее время проводится оптимизация количества основных компонентов для уменьшения фоновых показателей и снижения вероятности получения ложноположительных результатов.

**Заключение.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработана тест-система для качественной оценки содержания иммуноглобулинов класса G к ВГЕ методом непрямого ИФА.

Таблица 2 — Оценка относительной чувствительности и специфичности разработанной иммуноферментной тест-системы для качественного определения анти-ВГЕ IgG

Тест-система ИФА для качественного определения анти-ВГЕ IgG	Экспериментальная тест-система для качественного определения анти-ВГЕ IgG		
	Положительные пробы по разработанной тест-системе	Отрицательные пробы по разработанной тест-системе	Всего
Положительные пробы по референсной тест-системе (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G, НПО ДС, РФ)	72/a	0/c	72 (a + c)
Отрицательные пробы по референсной тест-системе (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G, НПО ДС, РФ)	3/d	158/b	161 (d + b)
Итого	75 (a + d)	158 (c + b)	n = 233

*Примечание* — a — истинно положительные результаты; b — истинно отрицательные результаты; c — ложноотрицательные результаты; d — ложноположительные результаты.

2. В качестве иммуносорбента наиболее оптимально использование комбинации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 3-го генотипа ВГЕ в концентрации 2,5 и 0,25 мкг/мл соответственно.

3. Основные валидационные характеристики разработанной тест-системы показали высокую степень достоверности, относительную чувствительность не менее 99 %, относительную специфичность — 96 %.

#### Список использованных источников

1. Распространенность антител к вирусу гепатита Е у населения регионов Республики Беларусь / В. В. Давыдов [и др.] // Журн. микробиол., эпидем. и иммуноб. — 2022. — Т. 99, № 2. — С. 160–171. DOI:10.36233/0372-9311-236.
2. Pezzoni, G. Antigenic Characterization of ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus (HEV) / G. Pezzoni, L. Stercoli, E. Pegoiani, E. Brocchi // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — P. 1385. DOI:10.3390/v13071385.
3. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk / G. H. Lee [et al.] // *Gastroenterology*. — 2016. — Vol. 150, № 2. — P. 355–357.
4. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств / Г. И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиол., эпидем. и иммуноб. — 2019. — № 1. — С. 10–17.
5. Wang, Y. Hepatitis E Virus: Advances in Experimental Medicine and Biology / Y. Wang. — Springer: Dordrecht, 2016. — Vol. 948. — P. 250. DOI:10.1007/978-94-024-0942-0\_1.
6. Debing, Y. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice / Y. Debing, D. Moradpour, J. Neyts, J. Gouttenoire // *J. of Hepatol.* — 2016. — Vol. 65. — P. 200–212.
7. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств / Г. И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиол., эпидем. и иммуноб. — 2018. — № 5. — С. 46–53.

## Development of a test system for enzyme immune assay for qualitative determination of immunoglobulin class g to hepatitis e virus

Zhavoronok S. V.<sup>1</sup>, Zadora I. S.<sup>1</sup>, Davydov V. V.<sup>1</sup>, Anisko L. A.<sup>2</sup>, Rogacheva T. A.<sup>2</sup>, Alatorseva G. I.<sup>3</sup>, Lukhverchik L. N.<sup>3</sup>, Nesterenko L. N.<sup>3</sup>, Simirsky V. V.<sup>4</sup>, Shcherban A. I.<sup>4</sup>, Shchuka N. V.<sup>4</sup>, Mytko Y. A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup> Health Care Institution «City Clinical Infectious Diseases Hospital», Minsk, Republic of Belarus;

<sup>3</sup>FSBSI «Scientific Research Institute of Vaccines and Serums. I.I. Mechnikov», Moscow, Russian Federation;

<sup>4</sup>Unitary Enterprise «Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

When studying the intensity of the spread of hepatitis E virus (HEV) in the territory of the Republic of Belarus, it was found that the risk of meeting with the causative agent of this infection increases depending on the age of the population, while obliterated anicteric forms predominate, which greatly complicates differential diagnosis and can potentially lead to the spread infection and increased frequency of occurrence with the virus [1].

Currently, in the Republic of Belarus there is no national enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system for the qualitative determination of IgG antibodies to HEV in human blood serum. Despite the presence of foreign analogues, the development, production and implementation in practice of our own ELISA system for serological diagnostics is also of social and economic importance.

**Keywords:** HEV, ELISA, IgG, ORF2, ORF3, genotype 3.

Поступила 10.06.2022