

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е

*Нестеренко Л. Н., Зимарин Л. С., Алаторцева Г. И., Жукина М. В.,
Притворова Л. Н., Свитич О. А., Зверев В. В.*

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»,
г. Москва, Российская Федерация*

Реферат. Разработан прототип тест-системы для выявления антигена вируса гепатита Е в вакцинных препаратах, воде и молоке методом иммунохроматографического анализа. Получены растворы коллоидного золота наночастиц размером 40 нм, синтезированы конъюгаты наночастиц с моноклональными и поликлональными специфическими антителами. Данные иммунореагенты были использованы при изготовлении иммунохроматографических тест-полосок. Оптимизированы условия проведения анализа. В модельных экспериментах показана возможность применения теста для обнаружения маркеров вируса гепатита Е в вакцинных препаратах, образцах воды и молока.

Ключевые слова: антиген вируса гепатита Е, иммунохроматографический анализ, наночастицы коллоидного золота.

Введение. Гепатит Е, вызываемый вирусом гепатита Е, является опасным заболеванием с повсеместным распространением, в настоящее время признан важной глобальной проблемой общественного здравоохранения. Известно, что на территории РФ чаще всего встречается 3-й генотип вируса. Тече-

ние гепатита Е у людей клинически сходно с гепатитом А, но протекает более тяжело у лиц с иммуносупрессией и беременных, летальность среди которых может достигать 40 %.

На территории субъектов РФ в 2017 г. зарегистрировано 158 случаев гепатита Е, из

них 12,7 % — пищевой путь заражения, 5,3 % — водный, 5,3 % — контактно-бытовой. В остальных 77,8 % случаях пути передачи не установлены [1]. Однако результаты сероэпидемиологических исследований показывают не отражаемую официальной статистикой скрытую интенсивную циркуляцию вируса гепатита Е [2].

В связи с преобладанием алиментарного пути передачи инфекции, важным профилактическим подходом является выявление компонентов вирусных частиц (РНК или антигенов) вируса гепатита Е в продуктах питания и питьевой воде. Особенное значение при этом имеет быстрота получения результатов лабораторных анализов. Одним из экспресс-методов обнаружения антигенов вируса является метод иммунохроматографического анализа, сочетающий высокую скорость и чувствительность тестирования. Важным преимуществом метода является также возможность проведения исследования в условиях отсутствия специального оборудования и высококвалифицированного персонала.

Принцип действия иммунохроматографического теста основан на миграции биологической жидкости исследуемого образца вдоль мембраны по типу тонкослойной хроматографии. Вместе с образцом вдоль мультимембранного композита движется жидкая фаза, содержащая антитела, связанные с наночастицами коллоидного золота. Если в исследуемой жидкости присутствуют антигены, то происходит их связывание с мечеными наночастицами золота специфическими антителами (например, моноклональными мыши или поликлональными кролика к вирусу гепатита Е). В связи с этим происходит накопление антител с красителем вокруг антигена. Визуально это проявляется в виде окрашивания аналитической зоны тест-полоски. Краситель со свободными антителами мигрирует далее вдоль полоски и неизбежно взаимодействует со вторичными антителами (к иммуноглобулинам мыши или кролика соответственно), адсорбированными в контрольной зоне, что приводит к ее окрашиванию.

Одна из сфер применения подобных тестов — возможность контроля содержания основного вещества в вакцинных препаратах против гепатита Е.

Цель работы — разработка прототипа иммунохроматографической тест-системы для выявления антигена вируса гепатита Е в вакцинных препаратах, воде и молоке.

Материалы и методы. В работе использовали следующие реактивы и буферные растворы: Трис HCl, азид натрия, золотохлористоводородная кислота (Fluka, Германия), Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА), цитрат натрия (Merck, США), хлорид натрия, гидрокарбонат натрия, дигидрофосфат натрия гидроксид натрия (Helikon, РФ), буферные растворы — 0,02 М Na-фосфатный, 0,15 М NaCl, pH 7,4 (ФСБ); 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,6; вода, деионизированная на установке Milli-Q (Merck, США). Рекомбинантный антиген EVA01 экспериментальной вакцины против гепатита Е («Комбиотех», РФ). Полученные в ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова моноклональные антитела мыши и поликлональные антитела кролика к рекомбинантному белку экспериментальной вакцины против гепатита Е. Поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика — GAR («Имтек», РФ). Поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов мыши — GAM Iss («Имтек», РФ).

Наночастицы коллоидного золота размером 40 нм получали по методу Френса [3]. К 97,5 мл деионизированной воды добавляли 2,0 мл 1%-го раствора золотохлористоводородной кислоты ($H[AuCl_4] \times nH_2O$), доводили до кипения и при перемешивании добавляли 0,5 мл 1%-го раствора цитрата натрия. Смесь кипятили 10 мин, охлаждали и хранили при температуре 4–6 °С. Размер, дисперсность и оптические характеристики синтезированных НКЗ оценивали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (JEOL JEM ARM200F атомного разрешения (HAADF-STEM) с корректором аберраций объективной линзы и зонда и автоэмиссионным катодом FEG, оснащенный системой энергодисперсионного анализа (EDX) на основе GIF Quantum спектрометра с детектором CENTURIO EDX) и с помощью спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO (США) [4].

Концентрацию белка, стабилизирующую растворы наночастиц золота, определяли по графикам флокуляционных кривых в зависимости от концентрации антител и pH

растворов [5, 6]. Титрование проводили в лунках 96-луночного полистиролового планшета (Greiner, Австрия). Для этого готовили серию растворов коллоидного золота с различными значениями pH от 5,5 до 9,0 с шагом 0,5 добавляя в них 0,1 М раствор карбоната натрия и растворы антител в ФБ с концентрациями от 1 до 50 мкг/мл. В лунки планшета в горизонтальном направлении вносили растворы антител (10 мкл/лунка). Затем в вертикальном направлении в лунки добавляли по 100 мкл раствора коллоидного золота с различным pH. После инкубации в течение 15 мин в каждую лунку добавляли по 20 мкл 10%-го раствора хлорида натрия. Через 10 мин измеряли спектры поглощения всех образцов при длинах волн 520 и 580 нм на планшетном спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO (США) по программе Skanti RE 5.0. Для оценки эффекта стабилизации вычисляли разность оптической плотности растворов на 520 и 580 нм ($A_{520} - A_{580}$). По этим данным строили графики зависимости разности ($A_{520} - A_{580}$) от концентрации антител для каждого значения pH. На основании полученных результатов определяли интервалы значений pH и концентраций высокомолекулярного компонента, которые использовали для синтеза препаратов антител, конъюгированных с наночастицами золота.

Для получения конъюгатов на основе наночастиц золота в пробирки вносили определенное количество моноклональных или поликлональных антител к белку EVA01 и добавляли соответствующее количество раствора наночастиц, перемешивали 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли БСА до концентрации 0,25 % и перемешивали еще 15 мин. Далее раствор центрифугировали при 4 °С при 10 тыс. об/мин (Beckman J2-21, США). Осадок ресуспендировали в ФСБ, измеряли оптическую плотность при $\lambda = 520$ нм и хранили при температуре 4 °С.

Сборку мультимембранного композита проводили по следующей схеме. На мембрану марки KinBio с помощью прибора IsoFlow Dispenser сорбировали: для формирования контрольной полосы GAR или GAM Iss в концентрации 0,5 мг/мл. Для аналитической зоны использовались моноклональные антитела мыши или поликлональные антитела

кролика к белку EVA01 в концентрации 1 мг/мл. Конъюгаты наночастиц коллоидного золота с антителами к белку EVA01 наносили на стекловолоконную мембрану в разведении $OP_{520} = 10.0$.

Для проведения иммунохроматографического анализа тест-полоску вертикально помещали в лунку планшета для иммунологических реакций, содержащую раствор анализируемого образца известной концентрации, через 5 мин тест-полоску извлекали из лунки и размещали на горизонтальной поверхности, через 10 мин результаты анализа оценивали визуально.

Результаты и их обсуждение. При использовании данной методики удалось получить монодисперсный золь наночастиц золота. По результатам электронной микроскопии форма частиц была близка к овальной, средний диаметр составил в среднем 41 нм (рисунок 1) [3].

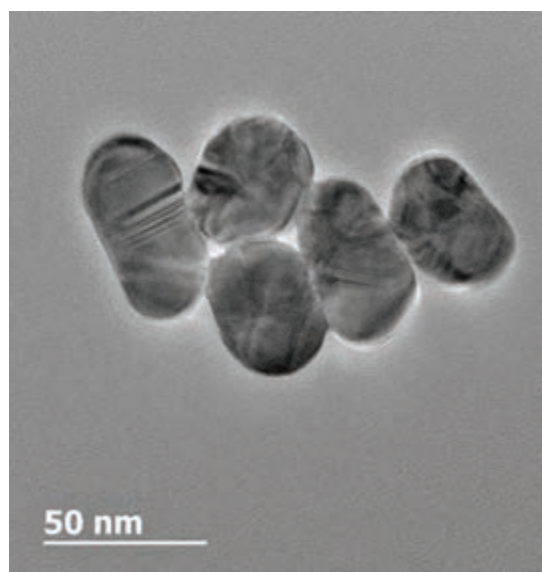


Рисунок 1 — Электронная микрофотография частиц коллоидного золота

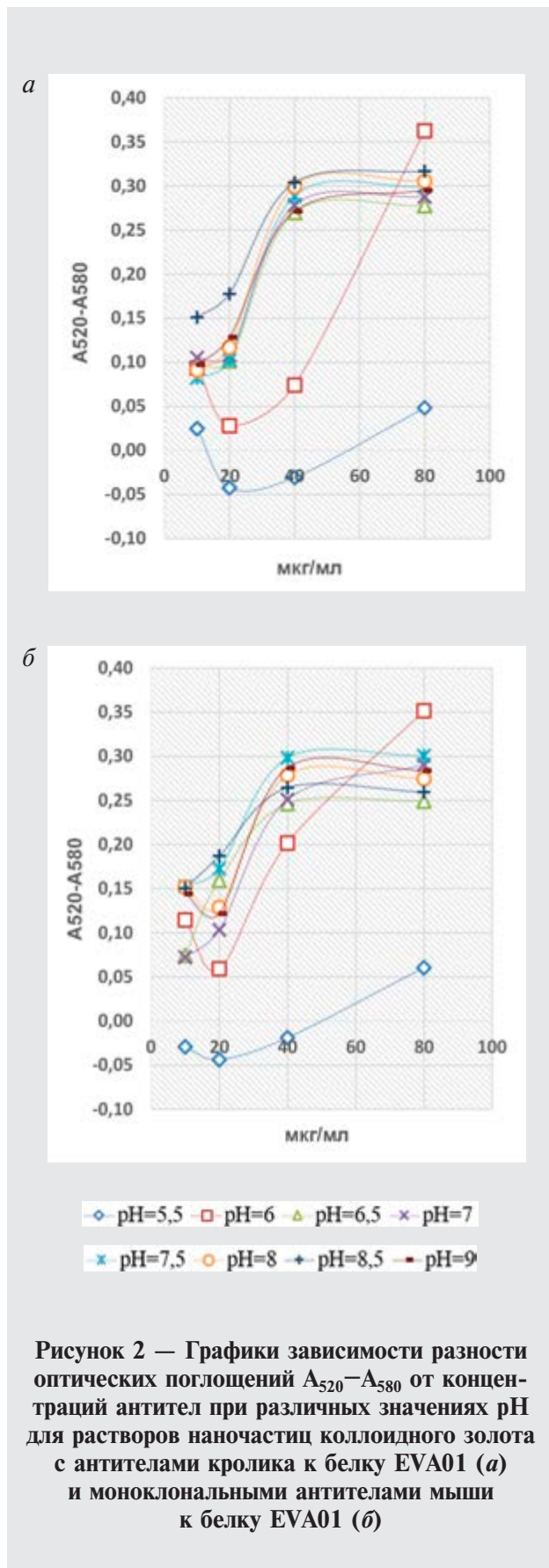
Задача получения антител, меченных наночастицами коллоидного золота, связана с сохранением иммунореактивности иммуноглобулинов, поэтому при отработке оптимальных условий синтеза мы учитывали влияние их концентрации и pH раствора на стабильность золя. При увеличении ионной силы раствора путем добавления 10%-го раствора хлорида натрия происходила агрегация нестабилизированных наночастиц, сопровождающаяся появлением пика при длине вол-

ны 580 нм, при этом происходило изменение цвета раствора с красного до серо-синего, вплоть до бесцветного. Цвет стабилизированного антителами коллоидного раствора золота не изменялся при добавлении в раствор электролита. Разность оптических поглощений растворов при 520 и 580 нм ($A_{520} - A_{580}$) в зависимости от концентрации антител при разных значениях pH коррелировала со стабильностью наночастиц. На рисунке 2 приведена серия кривых зависимости разности оптических поглощений от концентраций антител при различных значениях pH для наночастиц.

На основе графиков, представленных на рисунке 2, можно сделать вывод о том, что стабильность растворов конъюгатов антител с наночастицами мало зависит от значений pH, превышающих 6,0. По результатам проведенного эксперимента определены стабилизирующие концентрации: 40 мкг/мл для кроличьих антител к белку EVA01, 30 мкг — для антител мыши к белку EVA01. При синтезе конъюгатов мы добавляли на 10 % белка больше, чем рассчитано на основе флокуляционных кривых, поскольку в научной литературе имеются сведения о том, что добавление при синтезе конъюгата большего количества адсорбируемых белков повышает чувствительность получаемого иммунореагента [5].

Было сформировано два варианта мультимембранных композитов. В первом варианте в контрольной зоне были сорбированы антитела GAR, в аналитической зоне — IgG мыши к белку EVA01, конъюгат — наночастицы коллоидного золота, меченные IgG кролика против белка EVA01. Во втором варианте — в контрольной зоне были сорбированы антитела GAM Iss, в аналитической зоне — IgG кролика к белку EVA01, конъюгат — наночастицы коллоидного золота, меченные моноклональными антителами мыши к белку EVA01.

Оценку чувствительности двух вариантов тест-полосок на сериях последовательных разведений полупродукта производства экспериментальной вакцины против гепатита Е (белок EVA01) от 10 до 0,07 мкг/мл. При снижении концентрации аналита уменьшалась степень окрашивания аналитической полосы. При концентрации белка 0,07 мкг/мл аналитическая полоса окраши-



валась ярче, чем соответствующая зона отрицательного контроля, где тест-полоска была помещена в буфер белка EVA01. Сравнительный анализ исследованных вариантов тест-полосок показал, что второй вариант

(конъюгат наночастиц с IgG мыши против EVA01) является более чувствительным по сравнению с первым вариантом (конъюгат наночастиц с IgG кролика против EVA01) (рисунок 3).

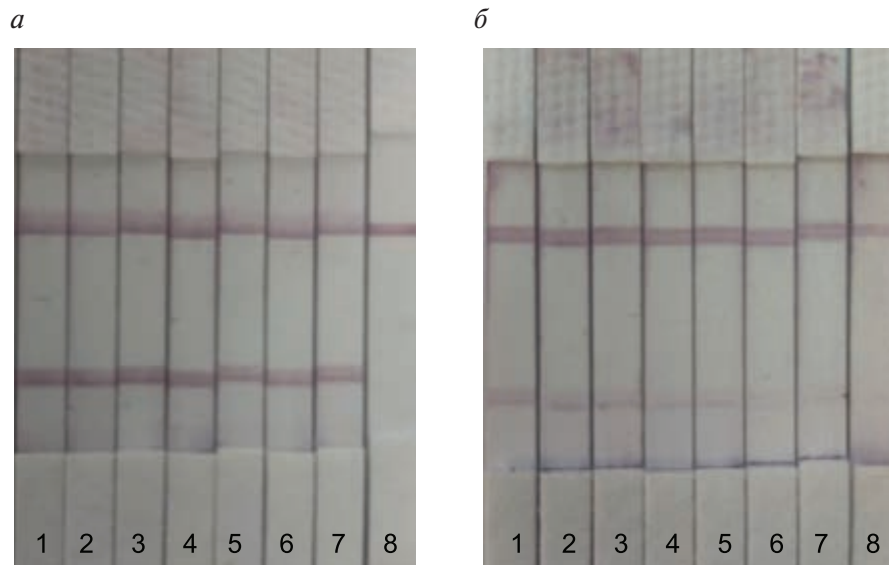


Рисунок 3 — Результаты определения белка EVA01 в полупродукте вакцины против гепатита Е с помощью двух вариантов тест-полосок:

а — в контрольной зоне — GAM Iss, в аналитической зоне — IgG кролика к белку EVA01;
б — в контрольной зоне — GAR, в аналитической зоне — IgG мыши к белку EVA01. Концентрации белка EVA01 в пробах: 1 — 10,00; 2 — 5,00; 3 — 2,50; 4 — 1,25; 5 — 0,63; 6 — 0,31; 7 — 0,15; 8 — 0,00 (мкг/мл)

Важным практическим применением разрабатываемой тест-системы будет ее использование для анализа пищевых продуктов на присутствие маркеров вируса гепатита Е. Поэтому мы исследовали возможность определения антигена вируса в продуктах животноводства в модельном эксперименте на ультрапастеризованном молоке жирностью 3,2 % с применением второго варианта тест-полосок. Пакетированное молоко вскрывалось непосредственно перед экспериментом, заведомо не содержало вирусных частиц, поскольку технология его производства включает этап ультрафильтрации. Молоко частично обезжиривали с помощью центрифугирования при 14 000 об/мин и температуре 4 °С. Готовили двукратные разведения антигена EVA01 в молоке в концентрациях от 25 до 0,19 мкг/мл. Минимальная концентрация белка, при которой происходило окрашивание аналитической зоны, составила 0,19 мкг. В отрицательном контроле (молоко без добавления антигена) окрашивание не проис-

ходило, что указывает на отсутствие влияния матричного эффекта на специфичность реакции (рисунок 4). В проведенном параллельно эксперименте на серии разведений антигена в дистиллированной воде были воспроизведены результаты, полученные на разведениях в молоке, что указывает на отсутствие влияния матричного эффекта на чувствительность реакции.

Проведенные модельные эксперименты позволяют предположить о возможности применения разрабатываемой тест-системы для быстрого определения антигена вируса гепатита Е не только в полупродукте вакцины против гепатита Е, но и в пищевых продуктах. Учитывая водную природу многих вспышек гепатита Е в регионах с различной степенью эндемичности и показанную нами возможность выявления вирусного антигена в воде, разрабатываемую тест-систему можно рассматривать в качестве будущего инструмента проведения эпидемиологических исследований.

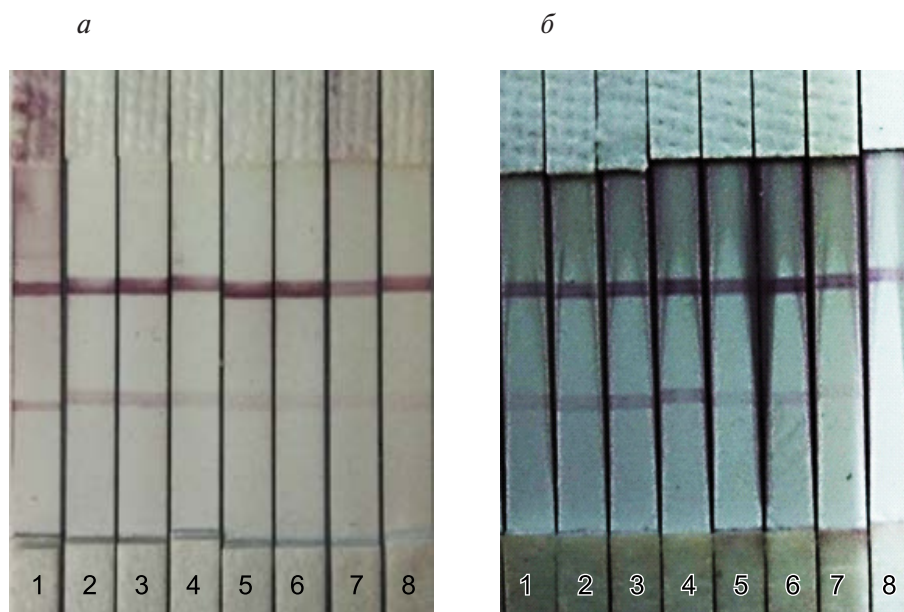


Рисунок 4 — Результаты определения содержания белка EVA01 в образцах разведений в воде (а) и молоке (б), концентрации: 1 — 25,00; 2 — 12,50; 3 — 6,25; 3 — 3,13; 4 — 1,56; 5 — 0,78; 6 — 0,39; 7 — 0,19; 8 — 0,00 (мкг/мл)

Заключение. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработан прототип тест-системы для выявления антигена вируса гепатита Е.

2. Показана возможность ее использования для качественного определения вирусного антигена в полупродукте экспериментальной вакцины против гепатита Е, а также в молоке и воде.

3. Для достижения поставленной цели были получены растворы коллоидного золота с заданным размером частиц, синтезиро-

ваны их конъюгаты с моноклональными и поликлональными специфическими антителами, отработаны оптимальные условия получения мультимембранных композитов, изготовлен прототип тест-системы для выявления антигена вируса гепатита Е.

4. Скорость определения и простота проведения анализа позволяют сделать предположение об его эффективности в качестве средства обнаружения маркеров вируса гепатита Е в вакцинных препаратах, объектах окружающей среды, пищевых продуктах.

Список цитированных источников

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 11-й выпуск / под ред. В. И. Покровского, А. А. Тоголяна. — СПб. : ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. — С. 41–42.
2. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nature Phys. Sci. — 1973. — Vol. 241. — P. 20–22.
3. Получение наночастиц коллоидного золота для диагностики гепатита Е методом иммунохроматографического анализа / Л. Н. Нестеренко [и др.] // Актуальная биотехнология. — 2020 — № 3 (34). — С. 281.
4. Влияние состава конъюгатов коллоидного золота с белками на эффективность их использования в иммунохроматографическом анализе / Н. А. Бызова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 3 — С. 337–345.
5. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза / Г. Н. Федюкина [и др.] // Биотехнология. — 2015. — № 1 — С. 85–92.
6. Вирусный гепатит Е. Современный взгляд на проблему / Е. Ю. Малинникова [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. — 2018. — № 20 (3). — С. 293–299.



Immunochromatographic test for detecting hepatitis E virus antigen

*Nesterenko L. N., Zimarin L. S., Alatortseva G. I., Zhukina M. V.,
Pritvorova L. N., Zverev V. V., Svitich O. A.*

*Federal State Budgetary Scientific Institution I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,
Moscow, Russian Federation*

A prototype immunochromatographic assay for hepatitis E virus antigen detection has been developed. Solutions of colloidal gold nanoparticles of 40 nm were obtained, conjugates of nanoparticles with monoclonal and polyclonal specific antibodies were synthesized. These immunoreagents were used in the preparation of immunochromatographic test strips. The experimental design of the assay were optimized. Model experiments have shown the possibility of using the test to detect markers of hepatitis E virus in vaccine preparations, water and milk samples.

Keywords: hepatitis E virus antigen, immunochromatographic analysis, gold nanoparticles.

Поступила 20.06.2023