

Н. И. Егорова, В. В. Порватова

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Научные руководители: д-р мед. наук, проф. Жаворонок С. В.,

н. с. ЛБМИ НИЧ БГМУ Арабей А. А.

Кафедра инфекционных болезней

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Работа выполнена по заданию: «Создание тест-систем для диагностики гепатита Е человека и испытание их диагностической эффективности на клиническом материале из эндемичных и неэндемичных регионов на территории Республики Беларусь» в рамках Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств-участников СНГ.

Резюме. В статье представлены этапы разработки диагностической тест-системы на антиген вирусного гепатита Е, основанной на «сэндвич»-методе иммуноферментного анализа с двухстадийной инкубацией. Рабочие характеристики лабораторного образца тест-системы были определены на экстрактах фекалий кроликов и свиней.

Ключевые слова: вирусный гепатит Е, определение антигена, ИФА.

Resume. This article presents designing stages of the test-kit for hepatitis E virus antigen detection, based on double antibody “sandwich” ELISA principle with two-step incubation. Working characteristics of the laboratory pattern of the ELISA kit were estimated on rabbit and pig fecal extracts.

Keywords: viral hepatitis E, antigen detection, ELISA.

Актуальность. Многочисленные серологические и молекулярно-генетические исследования доказали повсеместную распространенность вирусного гепатита Е (ГЕ) (рисунок 1) и его преобладание в качестве этиологического фактора случаев вирусных гепатитов с фекально-оральным механизмом передачи [4]. Аутохтонный характер эпидемиологического процесса в РБ, высокий процент инаппарантных форм ГЕ [1], в том числе среди доноров, случаи передачи вируса гепатита Е (ВГЕ) при трансфузии компонентов крови и наличие контингентов с тяжелым течением ГЕ (в том числе беременные женщины и иммунокомпрометированные пациенты) [4], делают

лабораторную диагностику ВГЕ весьма актуальной, в том числе и для Республики Беларусь.

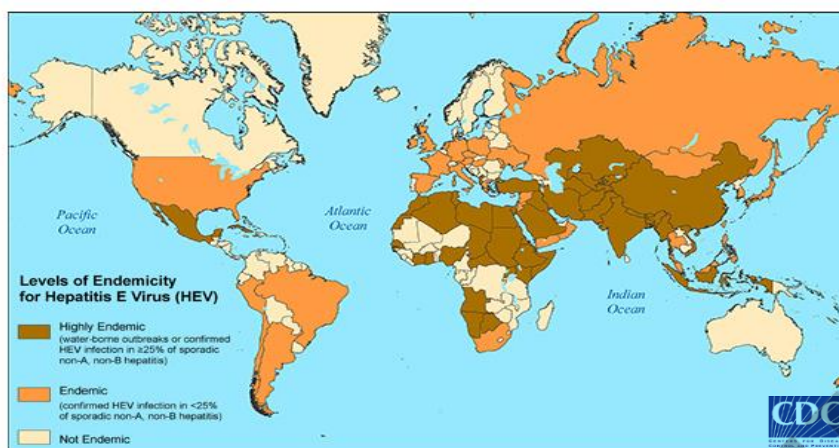


Рисунок 1 – Эндемичность стран в отношении вирусного гепатита Е по данным CDC [3]

Учитывая динамику иммунологического ответа, выявление антигена ВГЕ является более ранним показателем наличия инфекционного процесса по сравнению с определением иммуноглобулинов классов М и G. Высокую диагностическую значимость может иметь выявление антигена в ряде клинических ситуаций, например, при определении периода заболевания у реконвалесцентов с положительными результатами ИФА на Ig М к ВГЕ, диагностике ГЕ у пациентов с иммуносупрессией и в случае хронического ГЕ, серонегативного по анти-ВГЕ антител (АТ) [4].

Цель: разработка и изготовление лабораторного образца тест-системы для выявления антигена ВГЕ методом иммуноферментного анализа.

Задачи:

1. Получение специфических компонентов для иммуноферментного анализа на антиген ВГЕ.
2. Изготовление образца тест-системы для выявления антигена ВГЕ.
3. Отработка оптимальных условий постановки твердофазного ИФА для обнаружения специфического антигена ВГЕ.
4. Аппробация тест-системы на экстрактах фекалий кроликов и свиней.

Материал и методы. Работа по созданию тест-системы осуществлялась в несколько этапов.

Первоначально проводилось получение специфических компонентов для иммуноферментного анализа. Для выработки антител к ВГЕ проводили иммунизацию кроликов рекомбинантными белками ОРС2 и ОРС3 ВГЕ, предоставленными ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». С целью получения более высоких титров иммуноглобулинов были отобраны серопозитивные кролики, которые уже перенесли ВГЕ. Иммунизацию трех кроликов (2 самки и 1 самец) в возрасте 11-13 месяцев осуществляли по следующей схеме: 1 день – в бедренную мышцу вводили 200 мкг раствора полипептида ОРС2 кролику №1, 200 мкг раствора полипептида ОРС3 кролику №2 и по 100 мкг полипептидов ОРС2 и ОРС3 кролику №3; 2 день – препараты вводили внутривенно в той же дозировке; 3 день – повторяли процедуру внут-

ривенного введения препаратов. Через 1 неделю иммунизацию осуществляли повторно. На четвёртый день после последнего введения полипептида у кроликов забирали венозную кровь.

Для дальнейшего выделения иммуноглобулинов, полученную от трех кроликов кровь смешивали, отстаивали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов до образования плотного сгустка и отбирали сыворотку объемом 1,5 мл. Предварительное фракционирование гипериммунной сыворотки проводили риванол-сульфатным методом, для чего сыворотку смешивали с 0,3 % раствором риванола в соотношении 1:5. Полученную смесь выдерживали в холодильнике ночь при $+4^{\circ}\text{C}$ и по истечении времени инкубации центрифугировали при 14 тыс. оборотов в течение 30 минут. Супернатант, содержащий гамма-глобулины, переносили в новые пробирки и добавляли насыщенный при $+20^{\circ}\text{C}$ раствор сульфата аммония по каплям в соотношении 1:1 перемешивая. Затем смесь помещали в холодильник при $+4^{\circ}\text{C}$ для осаждения иммуноглобулинов на ночь и затем центрифугировали при 3 тыс. об/мин 15 мин. Осадок растворяли в 2,0 мл дистиллированной воды. Осаждение гамма-глобулиновой фракции сульфатом аммония проводилось трехкратно; осадок, полученный в результате последнего осаждения, растворяли в 2 мл дистиллированной воды и диализовали через нитроцеллюлозную мембрану против 0,01 М фосфатного буфера (рН 6,3) для удаления соли. С целью повышения чувствительности и специфичности тест-системы проводили дальнейшую очистку антител и выделяли Ig G-фракцию методом колоночной ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А50, уравновешенном 0,01 М фосфатным буфером (рН 6,3). Концентрацию белка в каждой из порций элюата определяли по оптической плотности раствора на спектрофотометре Stat Fax 303 (США) при длине волны 280 нм.

Выделенные Ig G использовали для синтеза конъюгата АТ с пероксидазой хрена. Для этого порции элюата, с которыми ИФА на планшетах с сорбированными полипептидами ОРС2 и ОРС3 давал положительные результаты, диализовали против 50-кратного объема 0,9% раствора NaCl. Получение белкового комплекса антитело-пероксидаза осуществлялось периодатным окислением по Nakane [2]. Для этого 6 мг пероксидазы (RZ-3.4) растворяли в 1 мл дистиллированной воды. К этому раствору добавляли 0,2 мл свежеприготовленного 0,1М NaJ₄ (21,384 мг/мл) и выдерживали 20 минут при комнатной температуре. Полученный раствор диализовали против 1М ацетатного буферного раствора рН 4,4 ночь при $+4^{\circ}\text{C}$. После этого проводили защелачивание пероксидазальдегидного раствора до рН 9,0-9,5 путем добавления 20 мкл 0,2 М карбонатно-бикарбонатного буферного раствора рН 9,5. Немедленно приливали 18,72 мг антител в 1мл 0,01М карбонатного буфера рН 9,5, предварительно диализованных. Реакционную смесь диализовали 2 часа при комнатной температуре против 0,01 М карбонатного буферного раствора рН 9,5. Добавляли 0,1 мл свежеприготовленного раствора NaBH₄ (4 мг/мл) и выдерживали 2 часа при $+4^{\circ}\text{C}$. Полученный концентрат конъюгата хранили при -20°C в 50% растворе глицерина с добавлением 1 % БСА.

На втором этапе проводилась раститровка разведений конъюгата и АТ к ВГЕ для определения оптимальной концентрации АТ для сорбции на полистироловый планшет и рабочего разведения конъюгата. Последовательные разведения АТ в 0,01 М

карбонатном буфере (КБ, рН 9,5) вносили в лунки отдельных стрипов 96-луночного полистиролового планшета фирмы «Медполимер» (Санкт-Петербург). После экспозиции в течение 1 часа при температуре +4 – +6 °С планшет отмывали промывающим раствором (ПР) и перекрестным методом наносили разведения конъюгата в ПР. Добавление субстрата позволило определить рабочее разведение конъюгата – оно составило 1:100. Сорбция АТ была максимальна при концентрации АТ 9 мкг/мл (рисунок 2).

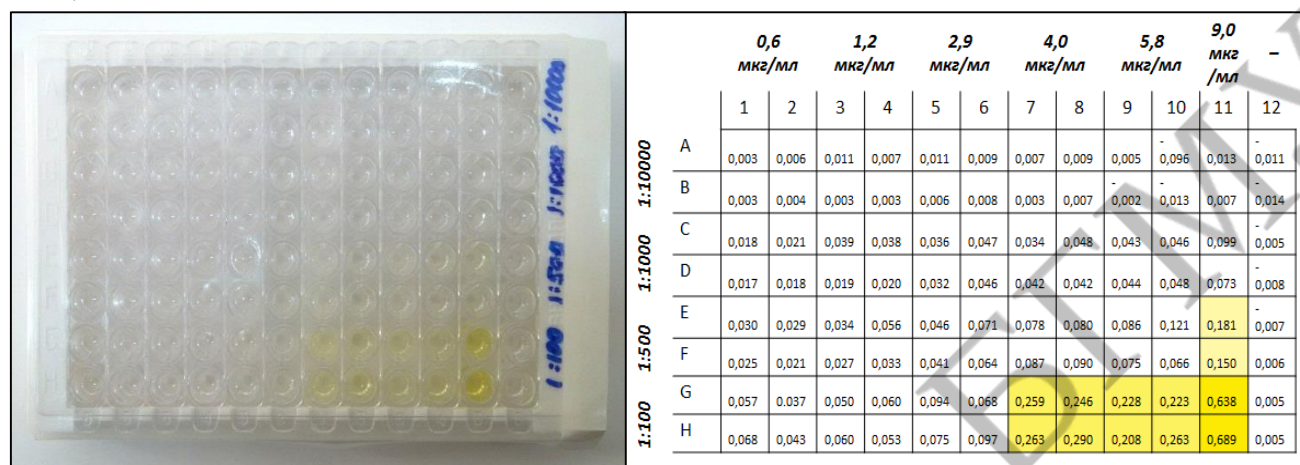


Рисунок 2 – Результаты раститровки последовательных разведений конъюгата и антител к ВГЕ на полистироловом планшете

Третий этап включал иммобилизацию антител к ВГЕ на твердой фазе. В лунки предварительно обработанного ультрафиолетовым излучением (для повышения адгезивности) планшета вносили по 100 мкл раствора АТ в 0,01 М КБ (рН 9,5), в концентрации 9 мкг/мл. После экспозиции в течение 1 часа при температуре +4 – +6 °С планшет отмывали ПР.

Четвертый этап сводился к проверке полученного образца тест-системы. Для этого готовили экстракты фекалий кроликов и свиней и исследовали их на наличие вирусной РНК методом ПЦР. Проводили ИФА экстрактов на сенсibilизированном АТ к ВГЕ планшете в учетом установленного рабочего разведения конъюгата. Результаты ИФА и ПЦР экстрактов фекалий свиней сравнивали между собой.

Результаты и их обсуждение. Опытный образец тест системы не реагировал с кроличьими экстрактами, что может быть связано с непродолжительной сохранностью ВГЕ в фекалиях кроликов (таблица 1).

Таблица 1. Результаты постановки ИФА с экстрактами фекалий кроликов и свиней

		0		0		0		0		0		0				
		П	О	П	О	П	О	П	О	П	О	П	О			
A	-	0	.004	p	0	.005	p	0	.002	p	0	.005	7	.150	5	.491
B	+	0	.004	p	0	.036	p	0	.006	p	0	.000	8	.290	6	.282
C	+	0	.003	p	0	.003	p	0	.005	1	.791	9	.179	7	.051	
D	+	0	.001	p	0	.007	p	0	.004	2	.455	10	.350	8	.009	

Е	p	0	p	0	p	0	3	.495	11	0	9	0
Ф	p	0	p	0	p	0	4	.647	12	0	0	0
Г	p	0	p	0	p	0	5	.463	13	0		
Н	p	0	p	0	p	0	6	.687	14	.262		

При постановке ИФА с экстрактами фекалий свиней в 65% образцов был обнаружен антиген ВГЕ. Однако сравнительный анализ исследования фекальных экстрактов свиней методами ИФА и ПЦР показал довольно низкую сопоставимость результатов (10%). Возможным объяснением этому может служить независимое друг от друга нахождение РНК и антигена вируса в фекалиях. Различия в результатах, полученных данными методами, продемонстрированы также в работе Gupta et al., исследование которых показало умеренную степень соответствия результатов ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ИФА на антиген HEV ($k=0.635$, $p<0.001$) [5].

Выводы:

1 Получены специфические компоненты для иммуноферментного анализа и изготовлен образец тест-системы для выявления антигена ВГЕ, определены оптимальные условия постановки твердофазного ИФА для обнаружения специфического антигена ВГЕ.

2 Проведена апробация разработанной тест-системы с использованием экстрактов фекалий кроликов и свиней.

N. I. Egorova, V. V. Parvatava

THE DESIGNING OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) KIT FOR HEPATITIS E VIRUS ANTIGEN DETECTION.

Tutors: professor S. V. Zhavoronok,

research officer of the scientific research department of BSMU A. A. Arabey

Department of Infectious Diseases

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература

1. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Н. Д. Ющук, Е. А. Климова, О. О. Знойко [и др.]; под ред. Н. Д. Ющука — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 160 с.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев [и др.]; под ред. А. М. Егорова. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.
3. Hepatitis E FAQs for Health Professionals // Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm>. — Дата доступа: 05.05.2017.
4. Hepatitis E Virus / Y. Geng, W. Gong, X. Guo [и др.]; под ред. Y. Wang. — Springer, 2016. — 250 p.
5. Role of hepatitis E virus antigen in confirming active viral replication in patients with acute viral hepatitis E infection / E. Gupta, P. Pandey, S. Pandey [и др.] // Journal Clin Virol. — 2013. — Vol. 58, Issue 2. — P. 374–377.