

А. В. Горбачева, И. И. Гацкевич
**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е**
Научный руководитель: д.м.н., проф. С. В. Жаворонок

*Кафедра инфекционных болезней
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

A. V. Gorbacheva, I. I. Gatskevich
**DEVELOPMENT OF THE IFA METHOD FOR DEFINITION OF SPECIFIC AN-
TIBODIES TO HEPATITIS E VIRUS**

*Tutors: professor S. V. Zhavoronok
Department of Infectious Diseases
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. В статье описаны этапы разработки чувствительной тест-системы для определения специфических антител к вирусу гепатита Е, основанной на методе иммуноферментного анализа. В ходе исследования испытывались две системы, базирующиеся на двух рекомбинантных белках, которые показали различную эффективность.

Ключевые слова: гепатит Е, ИФА, тест-система.

Resume. In article development stages of the sensitive test system for definition of specific antibodies to a virus of hepatitis E based on a method of an enzyme-linked immunosorbent assay. During the research two systems which are based on two recombinant proteins which showed various efficiency were tested.

Keywords: hepatitis E, ELISA, test system.

Актуальность. Гепатит Е – воспалительное инфекционное заболевание печени с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, этиологическим фактором возникновения которого является вирус гепатита Е (ВГЕ), который относится к семейству *Неревирidae* рода *Неревирус*. Ежегодно заболевает гепатитом Е 3,4 млн. человек, умирает - 70 тысяч человек, происходит 3 тыс. мертворождений.

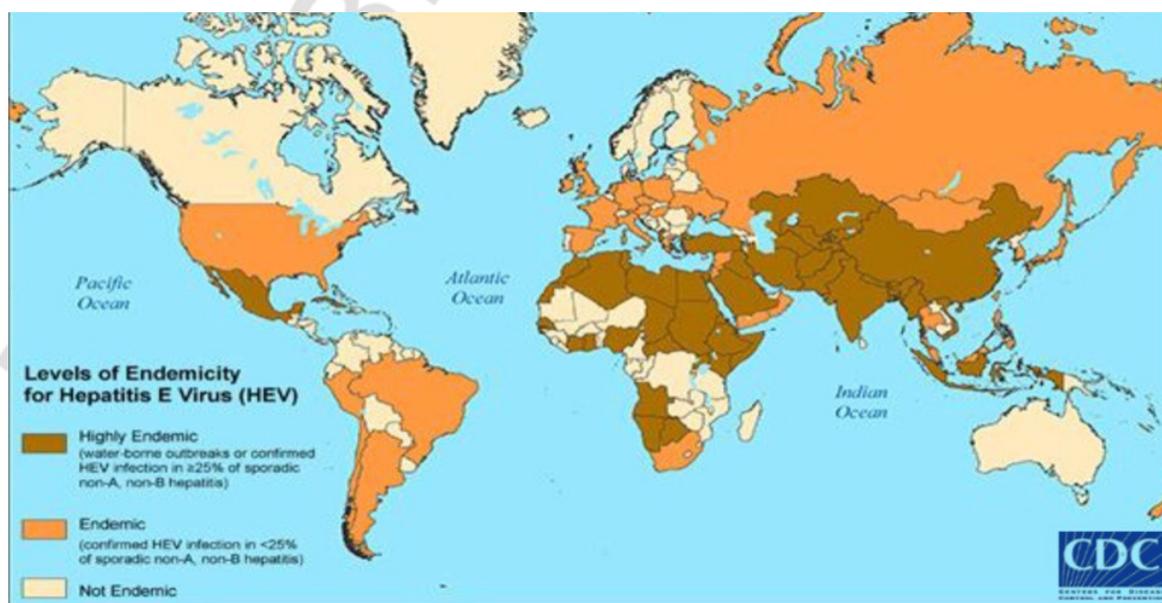


Рис. 1 – Эндемичность стран в отношении вирусного гепатита Е по данным Центры по контролю и профилактике заболеваний США.

Вирус гепатита E является на сегодняшний день важной причиной смертности, что представляет собой острую проблему глобального здравоохранения.

Цель: разработать метод ИФА для определения специфических антител к вирусу гепатита E.

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. Сравнение эффективности тест-систем, основанных на белках ORF2, ORF3 и комбинации данных белков.

Материалы и методы. Сыворотки анализировались методом ОТ-ПЦР с целью выявления РНК ВГЕ. Использовались положительные и отрицательные сыворотки. Положительные сыворотки были получены от людей инфицированных ВГЕ по результатам ПЦР и имеющих высокий титр специфических иммуноглобулинов класса G. Отрицательные сыворотки были получены от здоровых людей (не инфицированных ВГЕ по результатам ПЦР и не имеющих специфических антител). При разработке тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови инфицированных применялся формат «непрямого» иммуноферментного анализа. В качестве «твердой фазы» использовалась планшета для иммуноферментного анализа с покрытием антигеном лунок. Далее были использованы гибридные белки, полученные в результате объединения *in vitro* чужеродных фрагментов и содержащие новые сочетания последовательностей аминокислот. Данные аминокислотные последовательности включали иммунодоминантные аминокислотные последовательности, соответствующие белкам ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа. Протеины были получены в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова. Для этих целей готовили разведения рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 3 генотипа в различных концентрациях – ORF2 от 0,3 мкг/мл до 5 мкг/мл, ORF3 от 0,6 мкг/мл до 10 мкг/мл и комбинация ORF2 с ORF3 концентрацией 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно и концентрацией 2,5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл соответственно в 0,05М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,6). Сперва антигены поочередно пассивно сорбировали в лунках планшета для ИФА при +4°C. По прошествии 18 часов планшеты были промыты 4 раза раствором фосфатно-солевого буфера с 0,1% Твина-20 (pH 7,4) и блокированы 1% раствором казеина в 0,05М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6).

Полученные образцы сывороток крови были разведены в 10 раз с помощью фосфатно-солевого буфера с 0,1% Твина-20 (pH 7,4) и блокированы 1% казеина (pH 7,4). Далее полученные образцы сывороток вносили в лунки планшета по 100 мкл в дублях и инкубировали в течение 30 минут при +37°C.

По окончании инкубации планшеты промывали 4 раза ФСБ-Т. Козьи антитела к IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена вносили в разных разведениях по 100 мкл в каждую лунку на основе ФСБ-Т с 1% казеина (pH 7,4). После инкубации (30 минут при + 37°C) и четырех кратного промывания в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора с ТМБ (тетрамилбензидином, Sigma, США) и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут в темном месте. Далее для остановки реакции в каждую лунку был внесен 50 мкл 1М раствор H₂SO₄. Измерение

оптической плотности в лунках планшета осуществляли на спектрофотометре Stat Fax 3200 («Awareness Technology», США) при длине волны 450 нм с использованием референс-фильтра 630 нм.

Результаты и их обсуждение. Был подобран оптимальный вариант концентрации антигенов. Разработанная тест-система продемонстрировала высокую действенность в выявлении специфических анти-ВГЕ-IgG. Исследование показало различную эффективность в использовании систем, основанных на использовании рекомбинантных белков, включающих иммунодоминантные аминокислотные последовательности, соответствующие белкам ORF2 и ORF3. Положительный результат отмечался при концентрации антигена ORF2 0,3 мкг/мл. Следовательно, система с белком ORF2 оказалась чувствительнее.

Табл. 1. Оценка воспроизводимости метода с учётом всех измерений ОП каждого анализируемого образца

Номер образца	Среднее значение ОП	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
1	2,942 (2,857...>3)*	0,03	1,01
2	2,809 (2,757...>3)	0,033	1,17
3	2,874 (2,664...>3)	0,032	1,11
4	2,955 (2,923...>3)	0,021	0,71
5	2,850 (2,805...>3)	0,042	1,47
6	2,974 (2,630...>3)	0,051	1,71
7	2,943 (2,940...>3)	0,023	0,78
8	2,866 (2,630...>3)	0,05	1,74

* – минимальное и максимальное значения ОП

Табл. 2. Оценка воспроизводимости разработанного метода ИФА с учётом измерений ОП всех образцов.

	Значение ОП	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
Среднее значение по 1-му планшету	2,902 (2,761...>3) *	0,161	5,55
Среднее значение по 2-му планшету	2,847 (2,757...>3)	0,152	5,33
Среднее значение по 3-му планшету	2,945 (2,773...>3)	0,149	5,1
Среднее значение по трём планшетам	2,901 (2,776...>3)	0,154	5,31

* – минимальное и максимальное значения ОП

Выводы:

1 Получены специфических компоненты для иммуноферментного анализа на антиген ВГЕ.

2 Изготовлен образец тест-системы для выявления антигена ВГЕ.

3 Отработаны оптимальные условия постановки твердофазного ИФА для обнаружения специфического антигена ВГЕ.

4 Проведено сравнение эффективности тест-систем, основанных на белках ORF2, ORF3 и комбинации данных белков, которое показало, что система с белком ORF2 работает эффективнее.

Литература

1. Вирусные гепатиты. Клиника, диагностика, лечение / И. Д. Ющук, Е. А. Климова, О. О. Знойко [и др.]; / под ред. И. Д. Ющук. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 153 с.
2. Жаворонок, С. В. Иммуноферментный анализ : учеб. пособие для студентов 2-5 курсов / С. В. Жаворонок, Д. В. Тапальский. – Гомель: Гомельский государственный медицинский университет, 2004. – 28 с.

Репозиторий БГМУ