

Н.Г. Баяр, И.С. Задора
**ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ
К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
ПРИ СОЗДАНИИ ИММУНОСОРБЕНТА**

***Научные руководители: д-р мед. наук, проф. С.В. Жаворонок,
канд. биол. наук Г.И. Алаторцева****

Кафедра инфекционных болезней

**Лаборатория клонирования вирусных геномов*

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

**ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва*

N.G. Bayur, I.S. Zadora
**THE SPECTRUM OF RECOMBINANT POLYPEPTIDES STUDYING
TO CYTOMEGALOVIRUS INFECTION
FOR IMMUNOSORBENT CREATION**

***Tutors: MD, professor S.V. Zhavoronok,
PhD G.I. Alatorseva****

Department of Infectious Diseases

**Laboratory for cloning of viral genomes*

Belarusian State Medical University, Minsk

**I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow*

Резюме. Для разработки иммуноферментных тест-систем для определения иммуноглобулинов классов М к цитомегаловирусной инфекции оптимальный спектр сорбируемых белков должен включать р52. К белкам тегумента pp65, pp150 и pp28 стойко формируется иммунный ответ с высокими значениями коэффициента позитивности в большей степени у анти-ЦМВ IgG позитивных сывороток. Рекombинантные полипептиды к гликопротеину gB не оказывали существенного влияния на выявление иммуноглобулинов к ЦМВ.

Ключевые слова: ЦМВ, ИФА, IgM, IgG.

Resume. To develop enzyme immunoassay test systems for the determination of class M immunoglobulins to cytomegalovirus infection, the optimal spectrum of sorbed proteins should include p52. To the tegument proteins pp65, pp150, and pp28, an immune response is persistently formed with high values of the positivity coefficient to a greater extent in anti-CMV IgG positive sera. Recombinant polypeptides to gB glycoprotein had no significant effect on the detection of anti-CMV immunoglobulins.

Keywords: CMV, ELISA, IgM, IgG.

Актуальность. Цитомегаловирус (ЦМВ) поражает от 60% до 70% взрослых в промышленно развитых странах и до 100% в странах с развивающейся экономикой [1]. Инфекция обычно протекает бессимптомно у здоровых людей, но может быть опасной для пациентов с ослабленным иммунитетом, таких как ВИЧ-инфицированные, реципиенты трансплантированных органов или новорожденные [2]. После первичной инфицирования ЦМВ остается в организме человека пожизненно как латентная инфекция с возможностью реактивации. Острая и латентная форма заболевания у иммунокомпетентных лиц обычно протекает бессимптомно, однако есть данные, что ЦМВ может быть связан с гепатитом, неврологическими и кишечными симптомами, угнетением иммунитета,

функциональными нарушениями, при этом реактивация может произойти в любой момент [3,4].

Также неблагоприятно течение цитомегаловирусной инфекции у беременных женщин, так как вирус может внутриутробно поражать плод, вызывая врожденные аномалии развития [5,6]. Лабораторные методы диагностики включают молекулярно-генетическое тестирование с обнаружением вирусной ДНК и иммуноферментный анализ с определением иммуноглобулинов классов М и G.

Цель: изучить иммунологическую эффективность рекомбинантных полипептидов к цитомегаловирусной инфекции.

Задачи:

1. Сенсибилизировать полистирольные планшеты антигенами к ЦМВ в различных вариантах.
2. Определить оптимальный для сорбции спектр рекомбинантных полипептидов pp150, pp65, pp28, p52, gB-AD к ЦМВ.
3. Провести иммуноферментный анализ на клиническом материале с использованием разработанных иммуносорбентов.

Материалы и методы. В качестве твердой фазы использовались 96-луночные неразборные планшеты (МедПолимер, Санкт-Петербург). Рекомбинантные мультиэпитопные белки ЦМВ на основе консервативных последовательностей, включающих тегумент (pp150, pp65 и pp28), гликопротеин gB (pp38) и субъединицы ДНК-полимеразы (pp52) разработаны и предоставлены ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Указанные антигены разводились в КББ (рН 9,5) до концентрации 1 мкг/мл, наносились на твердую фазу и хранились при температуре +2...+8°C в течении 18-20 часов. После этого планшеты промывались в растворе на основе ФСБ-Т. В качестве биологического материала использовались сыворотки крови пациентов УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», в которых были обнаружены IgM и/или IgG антитела к цитомегаловирусу согласно референсной тест-системе «ВектоЦМВ-IgM» и «ВектоЦМВ-IgG».

Результаты и их обсуждение. Состав экспрессируемых вирусных белков отличается на разных стадиях ЦМВ-инфекции. Исследование антител к индивидуальным антигенам ЦМВ позволяет уточнить фазу инфекции (первичную, хроническую, латентную), что способствует точной верификации диагноза и выбору оптимальной схемы лечения.

Табл.1. Значения коэффициента позитивности в зависимости от сорбируемого белка

Пробы		Коэффициент позитивности (КП)				
		p52	pp65	pp150	pp28	gB-AD
1	IgM - IgG -	0,77	0,77	0,68	0,77	0,15
2	IgM + IgG +	1,8	5,07	1,68	4,96	0,68
3	IgM - IgG +	0,45	4,4	3,91	1,35	0,65
4	IgM - IgG +	0,6	1,2	2,7	2,39	0,77
5	IgM - IgG +	0,6	3,75	4,8	2,1	0,63
6	IgM - IgG +	0,91	0,87	1,17	1,74	0,52
7	IgM + IgG -	9,0	0,04	0,59	1,1	0,17

При изучении структуры вирионов основное внимание к себе привлекают белки тегумента, в частности pp65, pp150 и pp28. Эти белки вовлечены во все стадии жизненного цикла ЦМВ: внедрение вируса в клетку-хозяина, экспрессию вирусных генов, уклонение от иммунного надзора, сборку вириона и выход вирусных частиц из клетки. Кроме этого, с белком p65 связывают способность вируса ускользать как от врожденного, так и приобретенного иммунного ответа, что поддерживает его пожизненную циркуляцию в организме человека. Согласно данным табл.1 к данным белкам стойко формируется иммунный ответ с высокими значениями КП (коэффициент позитивности) в большей степени у анти-ЦМВ IgG позитивных сывороток. Выявлено, что белки pp150 и pp28 реагировали со всеми сыворотками, содержащими IgG к ЦМВ. Отрицательная сыворотка по отношению к ЦМВ не сработала с рекомбинантными белками, что свидетельствует о высокой специфичности антигенов.

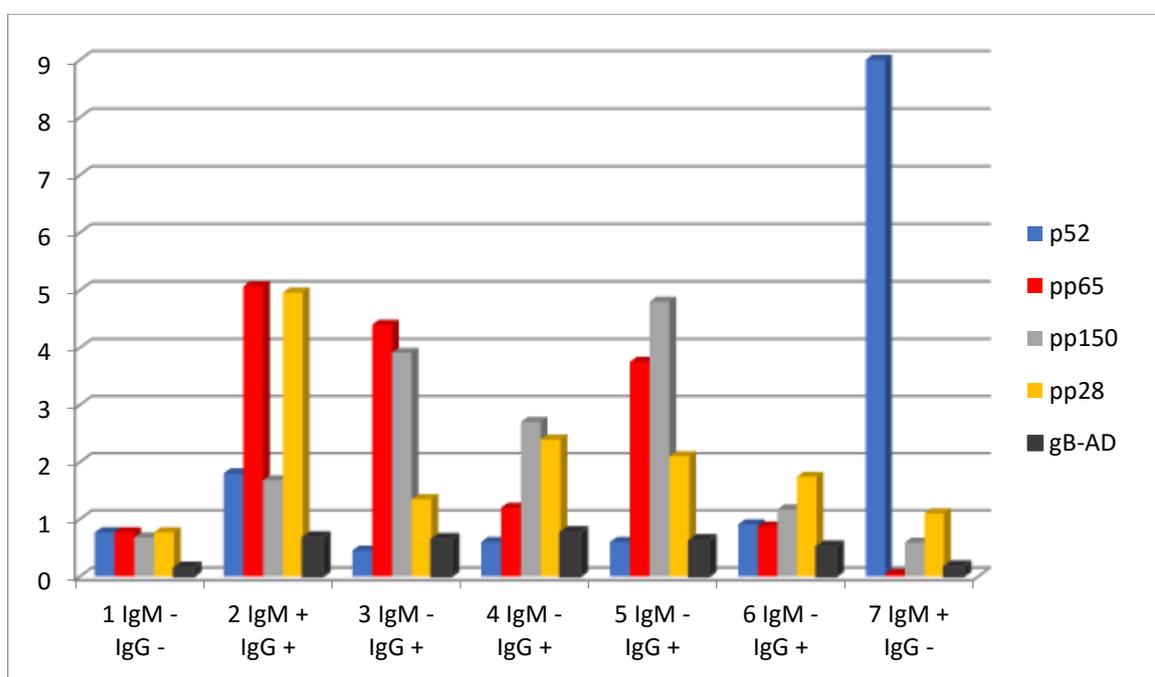


Рис. 1 – Результаты сорбции спектра рекомбинантных антигенов к ЦМВ при исследовании на клиническом материале

По результатам исследования рекомбинантных антигенов (рисунок 1) установлено, что для детекции только иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусной инфекции наибольший КП имеет p52 (КП=9,0). Антиген pp52 известен как ДНК-связывающий фосфопротеин, относится к неструктурным белкам вируса, образуется в предранний период цитомегаловирусной инфекции.

Сорбция иммунодоминантных эпитопов к гликопротеину gB (pp38) не оказывала существенного влияния на выявление иммуноглобулинов к ЦМВ, значения коэффициента позитивности не превышало 1,0 ни в одной из исследуемых сывороток.

Выводы:

1. К белкам тегумента pp65, pp150 и pp28 стойко формируется иммунный ответ

с высокими значениями коэффициента позитивности в большей степени у анти-ЦМВ IgG позитивных сывороток.

2. Белки pp150 и pp28 реагировали со всеми сыворотками, содержащими IgG к ЦМВ.

3. Для детекции иммуноглобулинов класса М к цитомегаловирусной инфекции наибольший КП имеет белок p52, что коррелирует с информацией об образовании антител к данному антигену в предранний период цитомегаловирусной инфекции.

4. Сорбция иммунодоминантных эпитопов к гликопротеину gB (pp38) не оказывала существенного влияния на выявление иммуноглобулинов к ЦМВ.

Литература

1. Fülöp, T., Larbi, A., Pawelec, G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. / T. Fülöp, A. Larbi, G. Pawelec // *Front. Immunol.* – 2013. – № 4. – P.271
2. Ryan, K.J., Ray, C.G. Sherris. *Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases* / Ryan K.J., Ray C.G. – Volume 4. McGraw Hill; New York, NY, USA. – 2004. – P.556–569.
3. Acquired cytomegalovirus infections in immunocompetent adults / J.F. Faucher, B. Abraham, M. Segondy, O. Jonquet, J. Reynes, F. Janbon // *Presse Med.* – 1988;27. – P.1774–177
4. Cytomegalovirus and human immunosenescence / G. Pawelec, E. Derhovanessian, A. Larbi, J. Strindhall, A. Wikby // *Rev. Med. Virol.* – 2009. – №19. – P.47–56. doi: 10.1002/rmv.598.
5. Cytomegalovirus infection and risk of preeclampsia: A meta-analysis of observational studies / Z. Geraili, SM. Riahi, S. Khani, A. Rostami, M. Bayani, K. Hajian-Tilaki, M. Nourollahpour Shiadeh // *Caspian J Intern Med.* – 2018 Summer. – №9(3). – P.211-219. doi: 10.22088/cjim.9.3.211.
6. Dioverti, M.V., Razonable, R.R. Cytomegalovirus / M.V. Dioverti, R.R. Razonable // *Microbiol Spectr.* – 2016. – № 4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.