

Антоненко В.В.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ ЛИА-ТЕСТ КАК ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ, СПЕЦИФИЧНЫЙ МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ШИРОКОМУ СПЕКТРУ АНТИГЕНОВ ВИРУСА SARS-COV-2

Научные руководители: д-р мед. наук, проф. Владыко А.С.,

д-р биол. наук Фомина Е.Г.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск

Актуальность. В научной литературе представлены исследования, касающиеся выявления антител к двум основным вирусным антигенам: спайковому белку (S), нуклеокапсидному белку (N). Исследований, касающихся серологической реактивности одновременно к спектру белков вируса SARS-CoV-2 все еще крайне мало ввиду отсутствия доступных серологических тестов.

Цель: разработать доступный, чувствительный и специфичный «home-made» лиа-тест для определения иммуноглобулинов G (IgG) одновременно к трем основным антигенам вируса SARS-CoV-2: S-, N-, M-белкам.

Материалы и методы. В качестве антигенов использовали следующие рекомбинантные белки вируса SARS-CoV-2: S-белок («BEI Resources», США), M-белок («Fitzgerald», США), N-белок («Thermo Fisher Scientific», США). Для нанесения белков применяли нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,22 мкм («GSV», США), 0,45 мкм («ADVANTEC», Япония) и 0,8 мкм («Millipore Corporation», США). Для проведения иммуноферментного лиа-теста использовали конъюгат мышинных антител к IgG человека, меченых пероксидазой хрена («Thermo Fisher Scientific», США), субстрат-индикаторный раствор ДАБ (3, 3' – диаминобензидин тетрагидрохлорид). Использовали 34 сыворотки крови пациентов, с подтвержденным положительным ПЦР-тестом назофарингеальных образцов, 10 сывороток, собранных до начала пандемии. Референтными тест-системами, подтверждающими положительный /отрицательный серологический статус пациента к S- и N-антигенам, служили: «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» «Вектор-БЕСТ» (Россия); «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G» производства «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» (Беларусь).

Результаты и их обсуждение. Для нанесения на мембрану использованы белки, экспрессируемые в различных системах: S-белок в клетках насекомых, M-белок в системе экспрессии *E. coli*, N-белок в клетках человека HEK293. Белки имеют различную молекулярную массу: S-белок 195 кДа, M – 25 кДа, N – 49,5 кДа, что имеет принципиальное значение для сорбции на мембрану. Экспериментальным путем установлено, что белки наиболее прочно фиксируются на нитроцеллюлозной мембране с диаметром пор 0,45 мкм в концентрации 0,12 мкг/мкл. По наличию/отсутствию полосы преципитации в зоне нанесения белка оценивали положительный или отрицательный результат присутствия IgG к определенному антигену. Антитела к S-белку выявлялись в 34 случаях из 34 положительных проб. Иммуноглобулины G к N-белку обнаружены в 22 серопозитивных пробах. Антитела к M белку присутствовали в 18 исследуемых образцах. Все серонегативные сыворотки показали отрицательный результат с использованием «home-made» лиа-теста.

Выводы: разработан высокоспецифичный, чувствительный, удобный в использовании иммуноферментный «home-made» лиа-тест для одновременного выявления специфических антител к спектру антигенов вируса SARS-CoV-2. Время исследования не превышает 3 часов. Разработанная технология позволяет расширить спектр наносимых на нитроцеллюлозную мембрану антигенов для исследования наличия антител в сыворотке крови пациента с COVID-19.