

Иммуноферментные тест-системы для детекции антител к вирусу гепатита Е в Республике Беларусь

Жаворонок С. В.¹, Задора И. С.^{1,2}, Давыдов В. В.¹, Симицкий В. В.²,
Щербань А. И.², Щука Н. В.², Мытько Ю. А.², Анисько Л. А.^{1,3},
Рогачева Т. А.^{1,3}, Алаторцева Г. И.⁴, Лухверчик Л. Н.⁴, Нестеренко Л. Н.⁴,
Зверев В. В.^{4,5}

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

²УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

³Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

⁴Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

⁵Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Вирус гепатита Е (далее – ВГЕ) представляет значимую проблему для здравоохранения, и совершенствование его лабораторной диагностики неоспоримо важно. Распространение его штаммов эволюционирует. Генетически этот вирус неоднороден, из 8 идентифицированных генотипов первые четыре (ВГЕ 1–4) чаще всего вызывают инфекции у людей [1, 2]. Согласно данным ВОЗ, в мире ежегодно происходит 20 млн случаев инфицирования гепатитом Е, из которых 3,3 млн сопровождаются клиническими симптомами. В 2015 г. от ВГЕ умерли приблизительно 44 тыс. человек, что составляет 3,3 % совокупной смертности от вирусного гепатита [3]. По информации проведенного систематического метаанализа, 1/8 мирового населения, что соответствует более чем 900 млн человек, когда-либо сталкивалась с ВГЕ-инфекцией [4]. Могут встречаться случаи ко-инфицирования с другими вирусными гепатитами (В, С), при этом ВГЕ можно выявить только с помощью лабораторных тестов, что осложняется отсутствием эпидемиологической настороженности, так как он часто протекает в скрытой субклинической форме.

Основной лабораторный показатель инфицирования – выявление в сыворотке крови специфических антител методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Из-за трудностей, связанных с культивированием ВГЕ, известные к настоящему времени диагностические тест-системы основаны главным образом на использовании рекомбинантных антигенов. Тем не менее большинство разработанных к настоящему времени тест-систем для диагностики гепатита Е методом ИФА основано на определении антител к ВГЕ 1-го и 2-го генотипов, являющихся строгими антропонозами.

Цель данной работы – разработать технологию изготовления иммуноферментных тест-систем для выявления антител IgG и IgM-классов к вирусу гепатита Е в сыворотке (плазме) крови человека.

Объектом исследований являлись рекомбинантные антигены – аналог белка ORF2 145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о. [5, 6] и ORF3 128,4 кДа – полноразмерный белковый продукт ORF3, С-концевой фрагмент [5, 7] ВГЕ 3-го генотипа (ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Россия). Использование полипептидов 3-го генотипа основано на эпидемиологических данных о его циркуляции на территории стран СНГ [8] и Республики Беларусь [9].

Для определения оптимума концентраций с целью создания иммуносорбентов антигены наносились на поверхности 96-луночных разборных полистирольных планшетов («Хема», Россия) в различных комбинациях, в смеси и по отдельности, по 110 мкл в каждую лунку. После инкубации под защитной пленкой в течение 16–18 ч при температуре +2...+8 °С лунки промывали 5 раз и для стабилизации иммобилизованных антигенов проводили обработку твердофазного носителя постпокрывающим раствором, включающим инертный белок, дисахарид, ингибитор протеиназ и бактериостатик, в течение 16–18 ч при температуре +2...+8 °С. После окончания инкубации раствор удаляли из всех лунок аспирацией, затем планшеты высушивали в течение 16–18 ч при температуре +20...+25 °С в ламинарном шкафу на листе фильтровальной бумаги вверх дном под углом. Сенсибилизированные планшеты помещали в фольгированную индивидуальную упаковку и хранили в холодильнике при температуре +2...+8 °С.

Биологическим материалом для лабораторного тестирования экспериментальных партий наборов ИФА для определения анти-ВГЕ IgM и анти-ВГЕ IgG являлись образцы сыворотки и плазмы крови, полученные от доноров, пациентов отделений городских клинических инфекционных больниц, лиц с хроническими вирусными гепатитами КДК, а также из других учреждений здравоохранения г. Минска (3 ГКБ, 5 ГКБ, РНПЦ ПиФ и др.).

Образцы сывороток пациентов из контрольной и основной групп исследования были протестированы на экспериментальной партии тест-системы «ИФА-набор: серия ИФА-ВГЕ-IgM-Э001» в параллели с референсной тест-системой «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия). Положительными считались образцы со значениями оптической плотности, равными или превышающими ОП критическое. Отрицательными – со значениями, не превышающими его.

В пробах крови контрольной группы для качественного определения антител класса М ($N = 38$) оптическая плотность не превышала критического значения в 97,4 % случаев (37 проб). В опытной группе пациентов ($N = 7$) в 100 % случаев определена оптическая плотность, превышающая референтное значение. Результаты тестирования проб при использовании экспериментальной партии ИФА тест-систем «ИФА-набор: серия ИФА-ВГЕ-IgM-Э001» для определения антител класса М к ВГЕ сопоставимы с результатами, полученными при исследовании проб референс-набором «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M».

Образцы сывороток пациентов из контрольной и основной групп также были протестированы на экспериментальной партии тест-системы «ИФА-набор: серия ИФА-ВГЕ-IgG-Э001» в параллели с референсной тест-системой «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). В пробах крови контрольной группы для качественного определения антител класса G к вирусу гепатита E ($N = 40$) оптическая плотность не превышала критического значения в 100 % случаев. В опытной группе ($N = 22$) в 100 % случаев определена оптическая плотность, превышающая референтное значение. У остальных групп пациентов с установленным наличием HBsAg (16 проб), ВИЧ-инфекцией (39 проб), антител к вирусу гепатита C (58 проб), ВПГ 1-го и 2-го типов (32 пробы), ЦМВ (28 проб), а также с гемолизом (26 проб) и гиперлипидемией (10 проб) показано отсутствие перекрестной неспецифичности. Таким образом, результаты тестирования проб при использовании экспериментальной партии ИФА тест-систем «ИФА-набор: серия ИФА-ВГЕ IgG-Э001» для определения антител класса G к ВГЕ сопоставимы с результатами, полученными при исследовании проб референс-набором «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G».

Также были проведены лабораторные испытания тест-систем с применением сыворотки крови пациента с установленным 1-м генотипом инфекции [10]. В результате были определены анти-ВГЕ IgM и IgG в высоких концентрациях, что показывает преимущества разработанных тест-систем и возможность их использования для сывороток крови людей с 1-м и 3-м генотипами вируса.

Таким образом, лабораторные испытания экспериментальных партий тест-систем ИФА для определения антител классов M и G к ВГЕ прошли успешно, с высокими показателями аналитической специфичности и чувствительности. Утверждены инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgG к вирусу гепатита E в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ-IgG человека», ТУ ВУ 100 185 093.094-2023, а также инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgM к вирусу гепатита E в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека», ТУ ВУ 100 185 093.093-2023.

Работа выполнялась в рамках нескольких научных проектов, в том числе международных: НИОКР научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета задания 7 «Создание тест-систем для диагностики гепатита E человека и испытание их диагностической эффективности на клиническом материале из эндемичных и неэндемичных регионов на территории Республики Беларусь» (срок выполнения 04.12.2015–31.12.2020 г., госрегистрация № 20 160 008 от 18.01.2016 г.) Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств – участников СНГ на период до 2020 г. «Создание тест-систем для серологической диагностики гепатита E и испытание их диагностической эффективности на клиническом материале из эндемичных и неэндемичных регионов», а также НИОКР «Разра-

ботать медико-технические требования к иммуноферментным тест-системам для определения антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита Е у человека. Создать контрольные панели сывороток крови человека, содержащих антитела к вирусу гепатита Е», выполняемой в рамках мероприятия 13 «Разработать технологию промышленного изготовления тест-систем для выявления антител IgG и IgM-классов к вирусу гепатита Е у человека и животных с использованием иммуноферментного метода анализа и организовать их производство» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Научные технологии и техника» на 2021–2025 гг.

Список использованных источников

1. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005 / D. B. Rein [et al.] // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55 (4). – P. 988–97. Doi: 10.1002/hep.25505. PMID: 22121109.
2. Codon Usage of Hepatitis E Viruses: A Comprehensive Analysis / B. Li [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol.13:938651. Doi: 10.3389/fmicb.2022.938651.
3. Hepatitis E: fact sheet [Electronic resource] / World Health Organization, 2023. – Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>. – Date of access: 20.10.2023.
4. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: a systematic review and meta-analysis / P. Li [et al.] // *Liver Int.* – 2020. – Vol. 40 (7). – P. 1516–1528.
5. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты) : пат. RU 2711907 C2 / Г. И. Алаторцева, А. В. Сидоров, Л. Н. Нестеренко [и др.]. – Опубл. 23.01.2020.
6. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств / Г. И. Алаторцева [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2019. – 96(1). – С. 10–17. Doi: 10.36233/0372-9311-2019-1-10-17.
7. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств / Г. И. Алаторцева [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2018. – 95(5). – С. 46–53. Doi: 10.36233/0372-9311-2018-5-46-53.
8. Оценка серопревалентности вируса гепатита Е 1 и 3 генотипов в регионах с разной эндемичностью методом линейного иммуноанализа / Г. И. Алаторцева [и др.] // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2022. – № 2. – С. 142.
9. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, на территории Республики Беларусь / С. В. Жаворонок [и др.] // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 11–22. Doi: 10.24411/2305-3496-2019-11001.
10. Молекулярно-эпидемиологическое исследование случаев острого гепатита Е в Беларуси / В. В. Давыдов [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – № 6. – С. 625–636.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Отделение биологических наук
ГНПО «Химический синтез и биотехнологии»

ЕВРАЗИЙСКАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ПЛАТФОРМА «ЕвразияБИО»

ИННОВАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

Материалы круглого стола, посвященного
80-летию освобождения Беларуси
от немецко-фашистских захватчиков

Минск, 5–7 июня 2024 г.

Минск
«Беларуская навука»
2024