

УДК 616.36-002-097-07: 541.183

## Отработка параметров сорбции и конъюгата при разработке средств диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа

Мунасар Хани Абдулрахман, Аль Шаби Аль Ханса Абдулрахман

Учреждение образования «Гомельский Государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

## The preparation parameters of the sorption and conjugate for the development of diagnostic method for parenteral viral hepatitis by the using of elisa method

Munassar Hani Abdulrahman, Alshabi Alkhansa Abdulrahman

Educational foundation Gomel governmental medical university, Gomel City, Belarus

### Аннотация

Подобраны условия покрытия твёрдой фазы и конъюгата для создания иммуноферментных тест-систем предназначенных для диагностики парентеральных вирусных гепатитов В и С. Иммуноферментная тест-система для выявления HBsAg с чувствительностью 0,1 нг/мл создана на основе моноклональных антител NF5 (sc-51943) и NE3 (sc-51942) подобранных путём анализа литературы и экспериментальных исследований. При конструировании тест-системы предназначенной для раздельного выявления анти-HCV к структурным (Core) и не структурным (NS3, NS4, NS5) белкам HCV провели подбор наиболее иммуногенных рекомбинантных и синтетических полипептидов HCV. Разрабатываемая тест-система позволяет оценить уровень иммунного ответа по отношению к отдельным белкам HCV. Аналитические параметры тест-систем подтверждены в результате успешных медицинских испытаний.

### Ключевые слова

иммуноферментный анализ, вирус гепатита В, HBsAg, вирус гепатита, рекомбинантные и синтетические полипептиды, моноклональные антитела.

Для лабораторной диагностики различной инфекционной патологии широко используется иммуноферментный анализ (ИФА), который является наиболее оптимальным, современным и одним из основных методов серологической диагностики парен-

### Summary

Selecting ELISA method by the use of solid phase technique which is designed for the diagnosis of parenteral viral hepatitis B and C. ELISA method for the detecting HBsAg in sensitivity of 0.1 ng/ml is based on monoclonal antibodies NF5 (sc-51943) and NE3 (sc-51942). Selection of method for the analysis of the literatures and experiments of the research investigations. During designation the test system which designed for individual detection of anti HCV against structural (Core) and non structural proteins (NS3, NS4, NS5) of HCV by choosing the most known immunogenic recombinants and the synthetic polypeptide HCV. Developing such test system reflects the situation of the level of the immune response according to the individual proteins of HCV. The analytical parameters of the test system supports the successful results of the medical examination.

### Key words

ELISA, HBV, HBsAg, HCV, recombinants and synthetic polypeptide, monoclonal antibodies.

теральных вирусных гепатитов В (HBV) и С (HCV) [1, 2, 3]. Основной задачей разработок модификаций современного ИФА является увеличение чувствительности при максимальной возможной специфичности, которая в идеале должна быть 100%. При диагностике ви-

русного гепатита В, решение данной задачи реализуется использованием для сорбции высокоспецифичных моноклональных антител [5, 6, 7]. В настоящее время предельной чувствительностью ИФА по выявлению HBsAg является уровень 0,05 нг/мл (фирма АВВОТТ автоматический вариант). Плашечные технологии позволяют добиться чувствительности 0,1 нг/мл [8]. При диагностике вирусного гепатита С для увеличения чувствительности и специфичности в качестве сорбируемых антигенов наряду с рекомбинантными белками применяют синтетические полипептиды моделирующие иммунодоминантные участки белков вируса [5, 6, 9]. Диагностические исследования с использованием ИФА проводятся на станциях переливания крови, в диагностических лабораториях, в центрах профилактики и борьбы со СПИД, на производствах лекарственных препаратов на основе крови человека. Тем не менее по данным американских авторов, даже при использовании иммуноферментных тест-систем четвертого поколения, позволяющих выявлять анти-НСV более чем в 99%, риск заражения крови например НCV составляет 1:103000 [5]. В свете вышеизложенного, создание диагностических иммуноферментных тест-систем отечественного производства обладающих высокой чувствительностью при максимальной специфичности безусловно является важной практической задачей современного здравоохранения [2].

### Материалы и методы

Для создания иммуноферментной тест-системы, предназначенной для выявления HBsAg проводили подбор клонов антител к HBsAg с требуемыми свойствами, используя литературные источники [8, 10, 11]. Было установлено, что в настоящее время существует как минимум 66 коммерчески доступных антител к HBsAg [10]. При апробации и анализе несколько вариантов коммерческих моноклональных антител различных производителей было установлено, что при высокой чувствительности максимальную специфичность даёт пара клонов: NF5 (sc-51943) и NE3 (sc-51942). Смесь данных антител использовалась нами для покрытия твёрдой фазы. Конъюгат этих же моноклональных анти-HBs с пероксидазой хрена RZ 3.0 («SIGMA», США) получали периодатным методом. Полученный конъюгат хранили в виде 10-кратного концентрата в 50%-ном растворе глицерина с

добавлением сыворотки крови доноров. Производитель моноклональных анти-HBs (ОАО «Капель», г. Москва).

При разработке иммуноферментной тест-системы для определения HBsAg в качестве химических компонентов использовали фосфатно-солевой раствор (ФСР-Т), содержащий 0,9 % NaCl, 0,1 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % твин-80, 20% мочевины, 0,02 % азид натрия, 0,5 % казеина, 0,2 % фенола, 10 % иммуноглобулина крупного рогатого скота или нормальной человеческой сыворотки в той же концентрации и 0,2% нормальной мышечной сыворотки – состав буфера подобран для увеличения специфичности.; раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); цитратный буферный раствор (рН 3,9-4,1), содержащий 0,015% перекиси водорода; 1 М раствор кислоты серной (стоп-реагент).

При конструировании тест-системы предназначенной для отдельного выявления анти-НСV к структурным (Core) и не структурным (NS3, NS4, NS5) белкам НCV подбор полипептидов для сорбции проводили так же используя открытые источники [5, 9]. Разрабатываемая таким образом тест-система позволяет оценить уровень иммунного ответа по отношению к отдельным белкам НCV.

В качестве антигенов НCV при разработке ИФА-теста мы использовали: синтетические белки для области Core (2-119 а для генотипов 1а, 3а) и НCV 34, для области NS3 – использовали рекомбинантные полипептиды (1356-1459aa, 1192-1459aa) и синтетические НCV-93, NS4 мозаичные для генотипов 1-4 (1691-1710aa, 1712-1733aa, 1921-1940aa и 1916-1947 aa), NS5 НCV (2016-2302 aa). Сорбция каждого из четырёх полипептидов (Core, NS3, NS4, и NS5) проводилась отдельно в чёткие стрипа соответственно.

В качестве конъюгата для этого теста использовали антитела против IgG (клон А5-А6) человека меченные так же пероксидазой хрена RZ 3.0 фирмы SIGMA 6782.

При изготовлении иммуносорбента в обоих тестах применялся метод «пассивной» адсорбции. В качестве твёрдого носителя использовали планшеты полистироловые для биохимических исследований российского производства ООО «Биомедикал» (г. Москва) и планшеты фирмы «Nunc» (Дания) которые для увеличения сорбционной ёмкости в течение 30 минут облучали под ультрафиолетом.

**Результаты и обсуждение**

*Тест-система для выявления HBsAg с заявленной чувствительностью 0,1 нг/мл.*

Для подбора оптимальных условий сорбции, оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при различных концентрациях моноклональных анти-HBs в растворе: в диапазоне от 0,2 до 32 мкг/мл. Для подбора оптимальной концентрации конъюгата также оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при различных концентрациях меченных пероксидазой хрена моноклональных анти-HBs в растворе: 1, 2, 4 и 8 мкг/мл соответственно. В качестве тестируемых образцов использовали сыворотки крови, верифицированные тест-системой Вектоген В - HBs - антиген (ФС 42-0117-0761-01). Условиями учёта реакции ИФА были установлены следующие: контрольные образцы должны были иметь показатели оптической плотности:  $K^+$  не ниже 0,7 единиц,  $K^-$  - не выше 0,15. Первоначальный анализ данных по подбору условий сорбции и конъюгата представлен в таблице 1.

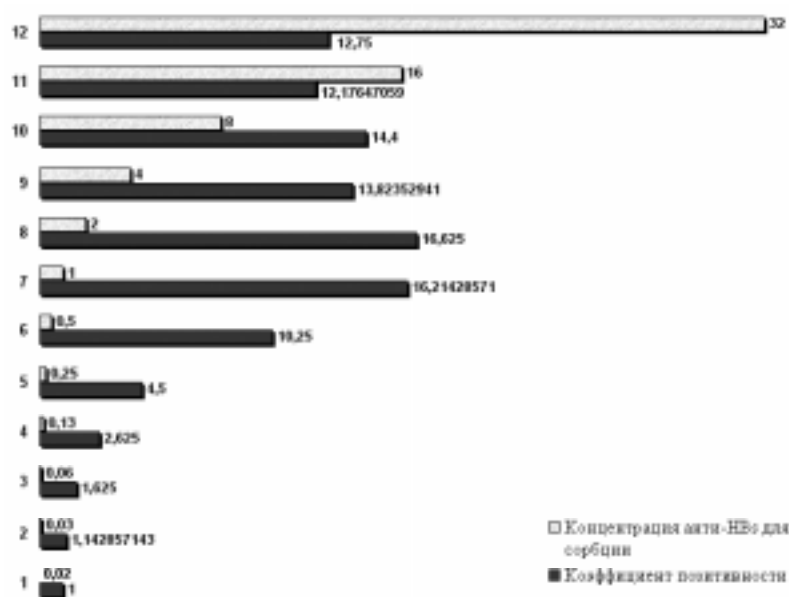
Как видно из таблицы 1, при исследовании концентрации конъюгата, результаты, соответствующие заданным условиям (значения ОП отмечены полужирным шрифтом) были получены при рабочем разведении 1:4800 при исходной концентрации 4,7 мкг/мл, таким образом оптимальная концентрация конъюгата составила 1 мкг/мл. При изменении концентрации сорбента в данном диапазоне 1- 8 мкг/мл существенной разницы в значениях ОП отмечено не было. Данный факт свидетельствует о насыщении сорбционной емкости планшета начиная с концентрации 1 мкг/мл.

На следующем этапе анализа использовали коэффициент позитивности - зависимую переменную: отношение средней оптической плотности положительных образцов к средней оптической плотности отрицательных образцов  $K = \frac{ОП\ пол}{ОП\ отр}$ . Критерием являлось достижение максимального значения  $K$ . Данные представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, максимальные различия между значениями оптической плотности (ОП) в контрольном положитель-

**Таблица 1**  
**Подбор концентрации моноклональных антител для сорбции и конъюгата**

Концентрация моноклональных анти-HBs для конъюгата (мкг/мл)	Значения оптической плотности				Сыворотки
1	0,120	0,141	0,123	0,119	K -
1	1,702	1,944	1,938	1,915	K +
2	0,157	0,184	0,162	0,158	K -
2	1,812	2,014	1,957	2,012	K +
4	0,260	0,288	0,273	0,255	K -
4	1,893	2,031	2,066	2,020	K +
8	0,300	0,356	0,310	0,310	K -
8	1,979	2,216	2,217	2,225	K +
1	1,487	1,855	1,790	1,903	57
1	0,257	0,227	0,253	0,256	3
2	1,612	1,918	1,820	1,975	57
2	0,359	0,318	0,338	0,336	3
4	1,655	2,020	1,924	2,077	57
4	0,760	0,640	0,666	0,649	3
8	1,797	2,029	2,028	2,090	57
8	1,001	0,762	0,796	0,878	3
	1	2	4	8	Анти-HBs для сорбции (мкг/мл)



**Рисунок 1. Коэффициенты позитивности при различных концентрациях сорбента анти-НВс**

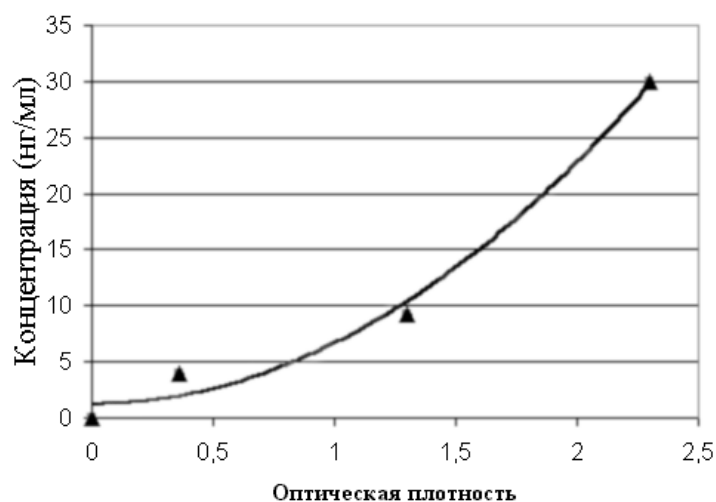
ном образце (К+) и величиной значений ОП в лунках, куда вносили контрольный отрицательный образец (К-), не содержащий НВсAg, наблюдались при двух концентрациях раствора моноклональных антител, используемого для покрытия твёрдой фазы - 1 и 2 мкг/мл. В то же время, при концентрации 1 мкг/мл значение ОП К- было ниже, а ОП К+ практически не отличалось от такового при концентрации 2 мкг/мл. Таким образом, концентрация 1 мкг/мл была сочтена оптимальной и использована в дальнейшей работе.

Для качественного учёта иммуноферментной реакции нами был выбран следующий вариант:  $ОП_{ср} К- \times 3$ , где  $ОП_{ср} К-$  - среднее значение оптической плотности К-. Для определения чувствительности и специфичности тест-системы проводили контроль содержания НВсAg с использованием тест-системы Вектоген В - НВс - антиген (ФС 42-0117-0761-01) с чувствительностью 0,1 нг/мл и отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-311-ОЗП «ОСО-НВсAg», позволяющего построить калибровочную кривую, в соответствии с инструкциями к ним.

Построение калибровочной кривой осуществляли на основе серийных разведений ОСО-НВсAg, согласно инструкции по эксплу-

атации фотометра АИФ М/340, начиная с нулевой концентрации НВсAg (нормальная сыворотка крови, не содержащая НВсAg и анти-НВс - входит в комплект ОСО-НВсAg) и далее последовательно 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 нг/мл. Разведение ОСО-НВсAg проводили используя нормальную сыворотку крови не содержащую НВсAg и анти-НВс, согласно инструкции на ОСО-НВсAg. По горизонтальной оси X или оси абсцисс откладывали значения оптической плотности, а по вертикальной оси Y или оси ординат значения концентраций.

Как видно из рисунка 2 для количественного определения величина поглощения образца должна находиться строго в диапазоне от 0,1 до 2,5 единиц оптической плотности (ОП). Для этого готовили последовательные двукратные разведения образца так, чтобы оптические плотности приготовленных разведений (не менее 3-х) лежали в линейной области используемого прибора. Для количественной оценки результатов определяли не менее 4-х повторов каждого разведения ОСО-НВсAg и исследуемого образца. При этом каждое повторение готовили отдельно из исходного стандарта / образца, чтобы оценить разброс результатов анализа при разведении стандарта/образца.



**Рисунок 2. Калибровочная кривая для определения концентрации HBsAg**

Величину специфичности (С) определяли по общепринятой формуле авторов P. Winkel, В.Е. Stanland [12]:

$$C(\%) = \frac{ИО}{ИО+ЛП} \times 100$$

где:

ИО (истинно отрицательные результаты) – число отрицательных проб из ОСО 42-28-311-ОЗП «ОСО-HBsAg» или проб верифицированных как отрицательные тест-системой Вектор-геп В - HBs-антиген (ФС 42-0117-0761-01) или аналогичной с чувствительностью 0,1 нг/мл., правильно распознанных испытываемой тест-системой (т.е. расцененных как отрицательные);

ЛП (ложноположительные результаты) – число отрицательных проб, ошибочно распознанных испытываемой тест-системой как положительные.

В результате проведения официальных медицинских испытаний на трёх клинических базах тест-системы все заявленные параметры чувствительности (0,1 нг/мл) и специфичности (100%) были успешно подтверждены.

*Тест-система для выявления анти-НСV отдельно к структурным и неструктурным полипептидам НCV*

Выбор пептидных фрагментов с предполагаемой антигенной активностью базировался на анализе гидропатических профилей и вторич-

ной структуры исследуемых областей вирусных белков, а также на литературных данных [5, 6]. Для подбора оптимальных условий сорбции, оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при различных концентрациях каждого из четырёх полипептидов (Core, NS3, NS4, NS5) в растворе: 0,1; 0,5, и 1 мкг/мл. Разведения конъюгата при исходной концентрации 5 мг/мл проводили в диапазоне от 25 000 до 100 000 раз. В качестве тестируемых образцов использовали внутрिलाбораторный контроль (ВЛК анти-ВГС) производства фирмы Вектор-Бест, а также сыворотки крови, верифицированные тест-системой РекомбиБест анти-НСV-спектр ФС 42-0117-1825-01. Для учёта реакции ИФА применяли следующие параметры: контрольные образцы должны были иметь следующие показатели оптической плотности: ОП К+ не ниже 0,6 единиц ОП, ОП К- – не выше 0,2 единиц ОП, граничное значение рассчитывали следующим образом:  $ОП_{кр. К-} + 0,15$  где  $ОП_{кр. К-}$  – среднее значение оптической плотности К-. Анализ результатов реакции при различных условиях её проведения представлен таблицей 2.

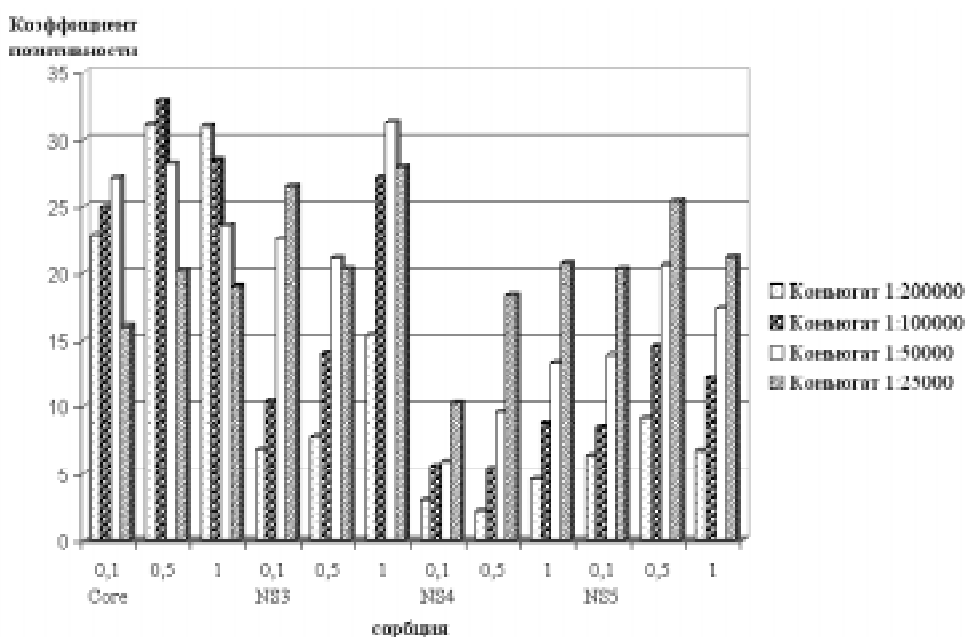
Как видно из таблицы 2 при анализе параметров конъюгата, результаты, соответствующие заданным условиям были получены при рабочем разведении 1:100 000 и 1: 50 000 при исходной концентрации 5 мг/мл. Таким образом

**Таблица 2**

**Оптическая плотность сывороток при различных концентрациях полипептидов для сорбции и при различных разведениях конъюгата**

Значения оптической плотности												Конъюгат	Сыворотки
												разведение раз	
0,18	0,23	0,24	0,06	0,10	0,07	0,12	0,07	0,08	0,13	0,14	0,09	200 000	21
0,18	0,20	0,62	0,10	0,11	0,09	0,13	0,09	0,09	0,13	0,15	0,10	100 000	21
0,21	0,31	0,51	0,15	0,12	0,09	0,18	0,10	0,07	0,14	0,15	0,11	50 000	21
0,65	0,40	1,30	0,34	0,17	0,13	0,30	0,22	0,21	0,21	0,22	0,18	25 000	21
2,01	2,45	2,85	0,45	0,87	1,37	0,26	0,23	0,468	0,47	0,79	0,71	200 000	К+
2,99	Е 04	Е 04	0,95	1,68	2,48	0,48	0,52	0,88	0,85	1,42	1,39	100 000	К+
Е 04	Е 04	Е 04	1,78	2,65	Е 04	0,58	1,04	1,46	1,41	2,30	2,17	50 000	К+
Е 04	Е 04	Е 04	2,61	Е 04	Е 04	1,124	2,244	2,439	2,41	Е 04	Е 04	25 000	К+
0,08	0,07	0,09	0,06	0,11	0,08	0,08	0,10	0,10	0,07	0,08	0,10	200 000	К-
0,12	0,09	0,10	0,09	0,12	0,09	0,08	0,09	0,10	0,1	0,09	0,11	100 000	К-
0,11	0,10	0,12	0,07	0,12	0,09	0,09	0,10	0,11	0,10	0,11	0,12	50 000	К-
0,18	0,14	0,15	0,09	0,14	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,14	25 000	К-
0,13	0,14	0,17	0,08	0,10	0,08	0,11	0,12	0,10	0,10	0,10	0,11	200 000	влк
0,19	0,25	0,27	0,12	0,12	0,11	0,17	0,12	0,11	0,12	0,11	0,13	100 000	анти-ВГС
0,29	0,41	0,44	0,20	0,15	0,12	0,29	0,17	0,24	0,15	0,15	0,14	50 000	влк
0,55	0,61	0,88	0,29	0,34	0,19	0,51	0,26	0,30	0,25	0,29	0,29	25 000	анти-ВГС
Core			NS 3			NS 4			NS 5				Полипептиды
0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1		Концентрация (мкг/мл)

Примечание: Е 04 – значение выше порогового значения прибора АИФ М/340



**Рисунок 3. Коэффициенты позитивности при различных вариантах сорбции полипептидов анти-НСV**

разведение 1 на 100 000 было сочтено оптимальным и использовано для дальнейшей работы.

На следующем этапе при анализе сорбции так же как и ранее в качестве зависимой переменной использовался коэффициент позитивности.

Как видно из рисунка 3 максимальные различия между значениями оптической плотности (ОП) в контрольном положительном образце (K<sup>+</sup>) и величиной значений ОП в лунках, куда вносили контрольный отрицательный образец (K<sup>-</sup>), не содержащий анти-НСV, наблюдались: для области CORE 2-119 aa и HCV 34 в концентрации 0,5 мкг\мл, для области NS3 – 1356-1459aa, 1192-1459aa и синтетические HCV-93 в концентрации 1 мкг\мл, для области NS4 в

концентрации 1 мкг\мл, для области NS5 в концентрации 0,5 мкг\мл.

В результате проведения официальных медицинских испытаний на трёх клинических базах тест-системы все заявленные параметры чувствительности и специфичности были успешно подтверждены.

### Заключение

В результате проведенных исследований были подобраны параметры сорбции и конъюгата для иммуноферментных тест-систем предназначенных для диагностики парентеральных вирусных гепатитов В и С с высокой степенью чувствительности и специфичности, подтвержденных в результате медицинских испытаний.

### Литература

1. Радченко В.Г., Шабров А.В., Нечаев В.В. Хронические заболевания печени (этиология, клиника, диагностика, лечение, эпидемиология и профилактика). - СПб.: Издательство «Лань», 2000: 192 с.
2. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Метод. рекомендации / сост.: С.В. Жаворонок, А.Л. Калинин, А.А. Ключарева, Н.С. Себут, В.С. Голуб, Ф.М. Фидаров, О.Г. Шиленок, В.А. Костюченко, С.И. Пиманов, Минск-Витебск, 1998, 51 с.
3. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. СПб.: ТЕЗА, 1998, 325 с.
4. Спектр антител к различным антигенам HCV при разных вариантах течения хронической HCV-инфекции / И.В. Круглов, О.О. Знойко, О.Л. Огиенко и др. Вопросы вирусологии 2002; №2: 11-16.
5. Ben-Porath E., Wands J.R., Marciniak R.A. et al. Structural Analysis of Hepatitis B Surface Antigen by Monoclonal Antibodies J. Clin. Invest. 1985; Vol. 76: 1338-1347.
6. Jolivet-Reynaud C, Dalbon P, Viola F et al. HCV core immunodominant region analysis using mouse monoclonal antibodies and human sera: characterization of major epitopes useful for antigen detection J Med Virol. 1998 Dec;56(4):300-9.
7. Sherlock S. Hepatitis C Virus: a Historical Perspective. Digestive Diseases and Science December 1996: 3S-5S.
8. van Roosmalen M.H., de Jong J.J., Haenen W. et al. A new HBsAg screening assay designed for sensitive detection of HBsAg subtypes and variants Intervirology. 2006;49(3):127-32
9. Набор антигенов для определения антител к вирусу гепатита С «ДС-НСV-антигены» Рос. Патент № 2262704 (2005.10.20) Бурков А.Н., Обрядина А.П., Уланова Т.И., Гладышева М.В.
10. Louisirirotchanakul S, Kanoksinsombat C, O'Charoen R, et al. HBsAg diagnostic kits in the detection of hepatitis B virus mutation within «a» determinant. Viral Immunol. 2006 Spring;19 (1):108-14.
11. Cooreman M.P., Roosmalen M.H., Morsche R. et al. Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to g145r and other naturally occurring a loop escape mutations. Hepatology Vol. 30; Issue 5: 1287-1292.
12. Winkel P, Statland BE, Bokelund H. Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: Short-term day-to-day and within-hour variation of serum constituents in healthy subjects. Clin Chem 1974; 20: 1520-7.