

Использование белков ORF2 и ORF3 для создания тест-системы для иммуноферментного анализа при вирусном гепатите E

С.В. Жаворонок¹, И.С. Задора¹, В.В. Давыдов¹, Т.А. Рогачева², Л.А. Анисько², Г.И. Алаторцева³, В.В. Сими́рский⁴, А.И. Щербань⁴, Н.В. Щука⁴, Н.Г. Баюр², Ю.К. Шебеко¹, Ю.А. Мытько⁴

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

³ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН, Москва, Россия

⁴ Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

The use of ORF2 and ORF3 proteins for creating an enzyme-linked immunosorbent assay for viral hepatitis E

S.V. Zhavoronok¹, I.S. Zadora¹, V.V. Davydov¹, T.A. Rogacheva², L.A. Anisko², G.I. Alatorseva³, V.V. Simirsky⁴, A.I. Shcherban⁴, N.V. Schuka⁴, N.G. Bayur², Yu.K. Shebeko¹, J.A. Mitko⁴

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

³ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

⁴ Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Аннотация

В связи с отсутствием национальных аналогов был разработан прототип тест-системы для иммуноферментного анализа (ИФА) для качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E (ВГЕ) на основе рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 3-го генотипа (ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Россия). Представлены результаты исследования образцов сывороток крови при помощи экспериментальной тест-системы, проводимых в параллели с референс тест-системой «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», Российская Федерация (РФ)). На выбранной рабочей концентрации ORF2 и ORF3 2,5 мкг/мл и 0,25 мкг/мл соответственно были исследованы 200 образцов сывороток доноров и пациентов. В статье отражены результаты определения чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Разработанная тест-система продемонстрировала высокую эффективность в выявлении специфичных анти-ВГЕ-IgG.

Ключевые слова

Вирус гепатита E, ВГЕ, ORF2, ORF3, ИФА, IgG.

Summary

Due to the lack of national analogies a prototype of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system was developed for the qualitative determination of antibodies class G to hepatitis E virus (HEV) based on the using of antigenic polypeptides ORF2 and ORF3 of the 3rd genotype (FSBSI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums», Russia). The results of experimental ELISA conducted in parallel with the reference test system «DS-ELISA-ANTI-HEV-G» (NPO Diagnostic Systems, Russia) are presented. The working concentrations of ORF2 and ORF3 antigens were 2.5 µg/mL and 0.25 µg/mL, respectively. They were tested with 200 donors and patients' serum samples. The article reflects the determination of sensitivity, specificity and reproducibility results. The developed test system demonstrated high efficiency in the detection of specific anti-HEV-IgG.

Keywords

Hepatitis E virus, HEV, ORF2, ORF3, ELISA, IgG.

Введение

Вирус гепатита E (ВГЕ) представляет собой небольшой квазиоболочечный вирус диаметром 27-34 нм с одноцепочечной РНК. Геном ВГЕ включает 3 области для считывания информации, называемые открытыми рамками считывания (ORF), каждая из которых выполняет определенные функции. Среди этих регионов ORF1 кодирует синтез неструктурных полипептидов, ORF2 кодирует вирусный капсидный белок, ORF3 кодирует функциональный ионный канал, играющий важную роль в высвобождении вирусных частиц [1].

Определение иммуноглобулинов класса G с помощью разрабатываемой тест-системы ИФА особенно актуально для нескольких групп людей. Установлено, что ВГЕ 3-го генотипа может привести к хроническому гепатиту с задержкой элиминации возбудителя у пациентов с ослабленным иммунитетом, после трансплантации органов, трансплантации стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных пациентов, гематологических пациентов, получающих химиотерапию, и людей, страдающих ревматологическими заболеваниями. Помимо данных групп риска, показано определение антител к вирусу гепатита E у беременных, доноров, лиц с острой и хронической патологией печени, охотников, ветеринаров, иностранных граждан, прибывших из эндемичных по вирусу гепатита E регионов [2, 3].

Серологические методы диагностики вирусных инфекций характеризуются простотой выполнения, доступностью, а также высокой диагностической чувствительностью и специфичностью.

Цель исследования: разработка новой тест-системы ИФА для качественного определения анти-ВГЕ IgG.

Материалы и методы

В качестве твердой фазы использовались разборные полистирольные 96-луночные планшеты на 12 стрипов (Хема, РФ). Схема разработки тест-системы ИФА включала в себя иммобилизацию рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 3-го генотипа, разработанных в ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», РФ [4, 5] в объеме 100 мкл/лунока на твердой фазе, инкубацию в течение 16-18 ч при температуре 2-8°C, промывку и постановку экспериментального исследования с положительными и отрицательными пробами сывороток крови с использованием контролей и конъюгата от набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» НПО «Диагностические системы», РФ (референс тест-система). Значение критической оптической плотности (ОП) для каждого экспериментального ИФА рассчитывалось с применением статисти-

стического подхода с прибавлением константы 0,2 для определения положительных и отрицательных результатов. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы для анализа данных Microsoft Excel пакета Microsoft Office операционной системы Windows 10.0.

Биологический материал получали от доноров, пациентов отделений городской клинической инфекционной больницы, лиц с хроническими вирусными гепатитами консультативно-диагностического кабинета (КДК), а также из других учреждений здравоохранения г. Минска. Все пробы сывороток проходили предварительные исследования на наличие или отсутствие антител класса G к ВГЕ с использованием референс-набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» НПО «Диагностические системы», РФ согласно инструкции производителя.

Результаты исследования

Выполнены постановки «непрямого» варианта ИФА квадратно-гнездовым методом с нанесением каждого из белков в лунку по отдельности и в совокупности. Рабочие концентрации рекомбинантных белков разводились в 0,05M карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,5-9,6) и составляли 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5 и 0,25 мкг/мл.

Установлено, что комбинация белков ORF2 в концентрации 2,5 мкг/мл и ORF3 в концентрации 0,25 мкг/мл является наиболее оптимальным вариантом, поскольку обеспечивает высокую оптическую плотность как положительного контроля из референс тест-системы, так и положительных на IgG к ВГЕ проб исследуемых сывороток при низких показателях отрицательного контроля и сывороток, не содержащих анти-ВГЕ IgG.

Всего было исследовано 14 положительных и 186 отрицательных сывороток. При этом в параллели с референс тест-системой ложноположительные и ложноотрицательные результаты отсутствовали. Таким образом, на данном этапе диагностическая чувствительность и специфичность составляют не менее 99%.

Для оценки воспроизводимости были проведены опыты на 2 планшетах с нанесенными белками в установленной концентрации 2,5 и 0,25 мкг/мл в параллели с набором «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и использованием двух положительных по IgG проб сывороток и отрицательных сывороток, предварительно объединенных в один пул (табл. 1).

Для определения внутрисерийной воспроизводимости использовались положительные сыворотки №1 (8 повторов) и №2 (32 повтора), анализ результатов проводился в пределах отклонения одной сигмы (табл. 1).

Таблица 1. Определение внутрисерийной воспроизводимости разработанной тест-системы ИФА для определения анти-ВГЕ IgG (планшет 1)

Номер образца	Среднее значение оптической плотности	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (CV), %
Положительная проба №1	1,392	0,203	10,5
Положительная проба №2	1,348	0,155	11,5
Отрицательные пробы	0,103	0,012	11,9

Таблица 2. Оценка воспроизводимости разработанного метода ИФА с учетом измерений оптической плотности всех положительных образцов

Номер образца	Значение оптической плотности (мин...макс)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (CV), %
Планшет 1	1,305 (0,821...1,796)	0,280	21,5
Планшет 2	0,822 (0,492...1,357)	0,208	25,3

Для оценки межсерийной воспроизводимости данные пробы в тех же повторах исследовались на планшете 2 с учетом измерений оптических плотностей всех образцов (табл. 2).

Данные показателя коэффициента вариации для оценки внутрисерийной воспроизводимости превышают допустимую величину в 10%, что может быть скорректировано в дальнейшем при использовании автоматического нанесения рекомбинантных полипептидов на производстве, а также при использовании блокирующих растворов для уменьшения неспецифического связывания и высоких фоновых показателей.

Заключение

Использование комбинации высокоиммуногенного ORF2 как основного белка в концентрации 2,5 мкг/мл и ORF3 в концентрации 0,25 мкг/мл как дополнительного является наиболее перспективным при создании тест-системы ИФА для качественного определения anti-ВГЕ IgG. Разработанный вариант «непрямого» ИФА обладает высокой диагностической чувствительностью – не менее 99% и специфичностью – не менее 99%, что позволяет использовать его для серологической диагностики в дальнейшем.

Литература

1. Debing Y, Moradpour D, Neyts J et al. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J. Hepatol.* 2016; V. 65: 200–212.
2. Wang Y. *Hepatitis E Virus : Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Dordrecht, 2016; Vol. 948. doi.org/10.1007/978-94-024-0942-0_1.
3. Жаворонок С.В., Карпов И.А., Михайлов М.И. и др. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, на территории Республики Беларусь. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2019; №1 (28): 12-23.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журн. микробиол., эпидем. и иммуноб.* 2019; №1: 10-17.
5. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; №5: 46-53.

Сведения об авторах

Жаворонок Сергей Владимирович – д.м.н., проф. каф. инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь. E-mail: zhavoronok.s@mail.ru.
Задора Илона Сергеевна – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь.
Давыдов Владимир Витольдович – к.б.н., доцент, зав. кафедрой биологии Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь.
Рогачева Тамара Альбертовна – к.м.н., доцент, врач высшей квалификации, зав. иммуноферментной лабораторией городской клинической инфекционной больницы, Минск, Беларусь.
Аниско Людмила Александровна – к.м.н., доцент, врач высшей категории, зав. лабораторией городской клинической инфекционной больницы, Минск, Беларусь.
Алаторцева Галина Ивановна – к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН, Москва, Россия.
Симирский Владимир Викторович – к.х.н., директор УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Минск, Беларусь.
Щербань Александр Иванович – к.б.н., начальник научно-технического отдела УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Минск, Беларусь.
Щука Наталья Владимировна – научный сотрудник УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Минск, Беларусь.
Баюр Надежда Геннадьевна – биолог городской клинической инфекционной больницы, Минск, Беларусь.
Шебеко Юлия Константиновна – студентка 6-го курса лечебного факультета Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь.
Мытько Юлия Александровна – научный сотрудник УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Минск, Беларусь.

Поступила 18.04.2022 г.