

**ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е ЧЕЛОВЕКА
НА ОСНОВЕ ПОЛИПЕПТИДОВ ORF-2 и ORF-3 ТРЕТЬЕГО ГЕНОТИПА
ВИРУСА ГЕПАТИТА Е**

Ю.К. Шебеко¹, 4 курс

Научные руководители – С.В. Жаворонок¹, д.м.н., профессор,

Л.А. Анисько¹, к.м.н., В.В. Давыдов, к.б.н., доцент,

Г.И. Алаторцева², к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,

²ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва

Введение. Гепатит Е представляет важную проблему здравоохранения на глобальном уровне. В настоящее время вирусный гепатит (ВГЕ) является самой частой причиной развития острого вирусного гепатита в Европейских странах и распространенной причиной гепатита во всем мире: 20 миллионов предполагаемых ежегодных инфекций и около 50000 предполагаемых смертей [1, с. 3168; 2, с.9]. Вирулентные для человека штаммы HEV включают ограниченные и энзоотические генотипы человека. Вирусы рода Orthohepevirus A также заражают кроликов (HEV-3ra), верблюдов и свиней [3, с. 74]. Инфекция ВГЕ обычно вызывает острый самоограничивающийся гепатит, однако молниеносная печеночная недостаточность может возникать у беременных женщин, пожилых пациентов или лиц, страдающих хроническим заболеванием печени [1, с. 3168; 4, с. 1256]. Такие пациенты требуют серьезного наблюдения [5;6].

Диагностика гепатита Е основана на клинико-эпидемиологических данных при исключении гепатитов А, В, С. Для диагностики используют метод иммунной электронной микроскопии; предложена тест-система для обнаружения антител к антигенам HEV. Диагноз подтверждается обнаружением методом ИФА в крови анти-HEV-IgM, который появляется к 10 дню заболевания и является в течение 1 - 2 месяцев. В ранние сроки возможна индикация РНК HEV в фекалиях и крови методом ПЦР, ELISA или иммунофлюоресцентное обнаружение вируса в фекалиях и биоптате печени [7, с. 783; 8, с.1441].

Несмотря на высокую социальную и экономическую значимость заболевания методы качественной диагностики гепатита, вызванного ВГЕ, требуют разработок новых методик и их оптимизации.

Материалы и методы. Перед нами была поставлена цель разработать ИФА для определения антител к вирусу гепатита Е. Для её выполнения плоскодонные 96-луночные полистироловые планшеты («Nunc», Дания) для ИФА были сенсibiliзирова ны 100 мкл рекомбинантных полипептидов, с иммунодоминантными аминокислотными последовательностями (белки ORF (ОРС - открытой рамки считывания)2 и ОРС3 ВГЕ 3-го генотипа (получены в ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», РФ) в 0,05 М КББ (рН 9,5) до концентрации по 5 мкг/мл каждого в отдельные лунки и 2,5 мкг/мл каждого при их одновременном использовании в одной лунке. Подбор оптимальной концентрации для каждого рекомбинантного антигена ВГЕ осуществляли отдельно методом шахматного титрования, после инкубации (18 часов, +4°С) планшеты 4 раза промыты 0,01 М раствором фосфатно-солевого буфера с 0,1% Твин-20 (ФСБ-Т, рН 7,4), после в лунки добавлено по 200 мкл 1% раствора казеина на основе 0,05 М КББ (рН 9,6), после инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре лунки 4 раза промыты раствором ФСБ-Т, затем высушены. Для проведения ИФА в сенсibiliзирова нные лунки 1, 2 вносили по 100 мкл отрицательных контрольных образцов, в лунку 3 – по 100 мкл позитивных контрольных образцов, в остальные лунки – по 100 мкл исследуемых образцов сывороток крови, разведенные в 10 раз раствором ФСБ-Т, содержащим 1% казеина. По окончании инкубации (30 минут, +37 °С) планшеты промывали 4 раза ФСБ-Т. В лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой хрена антител к IgG или IgM человека на основе ФСБ-Т с 1% казеина (БСА или желатина) (рН 7,4) в рабочем разведении. После инкубации (30 минут, +37 °С) и промывания в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора с ТМБ и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут в темном месте. Реакцию останавливали путем внесения 50 мкл 1 М раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности осуществляли спектрофотометрически при длине волны 450 нм с использованием референс-фильтра 630 нм. Для оценки диагностической надежности определены диагностическая чувствительность – 94,8% и диагностическая специфичность – 100%

Выводы. Таким образом, разработан и оптимизирован лабораторный вариант иммуноферментной тест-системы для качественного определения иммуноглобулинов класса G и M к ВГЕ в сыворотке крови человека с использованием рекомбинантных белков, включающих иммунодоминантные аминокислотные последовательности, соответствующие белкам ORC2 и ORC3 ВГЕ 3-го генотипа. Определены оптимальные концентрации для сорбции белков ORC2 и ORC3, составляющие 5 мкг/мл при отдельном использовании и 2,5 мкг/мл при совместном использовании. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы.

Список использованных источников

1. Эпидемиология гепатита Е в Юго-Восточной Европе в концепции «Единого здоровья» / Мрзляк А. [и др.] // World Journal of Gastroenterology. – 2019. – №25. – С.3168–3182
2. Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe / Adlhoch C. [et al.] // J. Clinical Virology 2016 – №82 – p.9–16].
3. Гепатит Е – актуальные проблемы изучения (2016–2018) / Михайлов М.И. [и др.]// Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 74–83.
Эпидемиология гепатита Е в Юго-Восточной Европе в концепции «Единого здоровья» / Мрзляк А. [и др.] // World Journal of Gastroenterology. – 2019. – №25. – С.3168–3182],
4. [Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection / EASL // Journal of hepatology. – 2018 – vol. 68 – p.1256–1271.
5. [Hepatitis E. [Electronic resource] // WHO – Mode of access: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/ – Date of access: 28.01.2020],
6. [Regional strategy for the prevention and control of viral hepatitis. [Electronic resource] // WHO. 2013. – Mode of access: www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/topics/CD_282.pdf. – Date of access: 28.01.2020].
7. [A Valuable Antigen Detection Method for Diagnosis of Acute Hepatitis E / Gui-Ping Wen [et al.] // Journal of Clinical Microbiology – 2015. – Vol. 53 – №3 – p.782–788.],
8. [Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. / Zhang F [et al.]. // J Med Virol – 2006. – № 78 – p.1441–1448.]