

УДК 616.36-002-07:616-097

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ HBsAg
С ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ****С.В. Жаворонок, Е.В. Воропаев, Мунасар Хани, В.М. Мицура, А.В. Воропаева****Гомельский государственный медицинский университет**

В соответствии с ГОСТом проведена разработка средств диагностики и контроля качества вирусного гепатита В, в основе которого лежит технология иммуноферментного анализа. Подготовлены технические условия на производство, программа и методика испытаний, проведены предварительные испытания иммуноферментной тест-системы для выявления HBsAg с высокой чувствительностью, а также стандартной национальной панелью сывороток с различным содержанием HBsAg.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, вирусный гепатит, HBsAg.

**METHODICAL APPROACHES TO CREATION DOMESTIC DIAGNOSTIC
THE TEST-SYSTEMS FOR REVEALING HBsAg WITH HIGH SENSITIVITY****S.V. Zavoronok, E.V. Voropaev, Munasar Hani, V.M. Mitsura, A.V. Voropayeva****Gomel State Medical University**

In conformity with national standard, design of diagnostics and monitoring methods to qualifying control of virus hepatitis B according to the basis of ELISA technology. Creation of test manual documentation, techniques of tests are prepared, preliminary researches in ELISA test-systems for revealing HBsAg with high sensitivity, and also standard national panels with various contents HBsAg.

Key words: ELISA, virus hepatitis B, HBsAg.

Первым идентифицированным вирусом, вызывающим вирусный гепатит с парентеральным механизмом заражения, является вирус гепатита В, наиболее известным серологическим маркером которого является HBsAg (поверхностный антиген вируса гепатита В), открытый в 1963 году Б. Бламбергом (Нобелевская премия 1976 года по разделу медицина) ранее известный как «австралийский» антиген, обнаруженный у аборигенов Австралии [3].

Наиболее оптимальным методом диагностики различных вирусных заболеваний является иммуноферментный анализ (ИФА) и его различные модификации. ИФА тесты сочетают высокую чувствительность и специфичность с возможностью проведения массовых определений, они могут быть в значительной степени автоматизи-

рованы, а результаты подвергнуты компьютерной обработке. Твердофазный иммуноферментный анализ широко применяется для серологической диагностики вирусных инфекций [7].

В настоящее время с учетом высокого числа больных HBV- инфекцией с субклинической, инаппаратной формой ГВ в Республике Беларусь назрела необходимость использования тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не ниже 0,1 нг/мл (Ме/мл). В связи с этим большое значение отводится выявлению HBsAg на ранних стадиях заболевания и обнаружению HBsAg в низких концентрациях, для чего необходима разработка относительно недорогих и простых в использовании и качественных методов диагностики, позволяющих решать эти задачи.

Материалы и методы

Разработка комплекта НТД велась в соответствии с СТБ 1019-96 ГОСТ РБ «Разработка и постановка на производство медицинских изделий».

HBsAg был очищен из объединенных сывороток больных, содержащих высокий титр антигена, используя колонку, несущую кроличьи антитела к HBs-антигену. Для получения очищенного препарата HBsAg брали 900 мл плазмы доноров-носителей HBsAg с исходным титром 1:2–1:4 и добавляли 100 мл 50% раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000. Плазму, содержащую 5% ПЭГ, инкубировали 60 минут при 4°C и отделяли выпавшие в осадок белки центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Осадок отбрасывали, а к осветленной надосадочной жидкости (900 мл) добавляли еще 100 мл 50% раствора ПЭГ. Смесь инкубировали при 4°C 60 минут и отделяли осадок центрифугированием при 10000 об/мин в течение еще 10 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок, содержащий HBsAg, ресуспендировали в 35 мл 0,3 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,05 моля трис-HCl буфера с pH 7,6. Осветленный центрифугированием раствор содержал HBsAg в титре 1:32–1:64 и протеины около 200 г/л. Белок определялся по методу Лоури (с реактивом Фолина). Затем данный концентрат подвергался ультрацентрифугированию в линейном градиенте сахарозы от 20 до 45% — 75 000 G в течение 10 часов. В каждую пробирку, содержащую 10,5 мл линейного градиента сахарозы, наслаивали 0,3 мл концентрата HBsAg. После окончания ультрацентрифугирования градиент фракционировали по 0,3 мл. Определяли рефрактометром плотность раствора сахарозы в каждой фракции и во фракциях с плотностью 1,1–1,2 кг/л проводили индикацию HBsAg. Для стандартизации условий исследования и контроля эффективности ультрацентрифугирования проводили спектрофотометрию градиента при его фракционировании. В конечном итоге получали препарат HBsAg в титре 1:4–1:8 и белок в концентрации не более 1,2 г/л. Для контроля за эффективностью очистки HBsAg и стандартизации условий все этапы фракционирования антигена контролировали диск-электрофорезом в полиакриламидном геле. Свя-

занный HBsAg был элюирован 0,1 М глицин/HCl pH 2,5 и немедленно диализирован против карбонатно/ бикарбонатного буфера (0,1 М, pH 8,3), содержащего 0,5M NaCl.

Концентрация полученного HBsAg была оценена иммуноферментным методом с использованием наборов реагентов фирм НПО «ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ» (Нижний Новгород) и Вектор Бест (Новосибирская область, п. Кольцово). Стандартизованные сыворотки были лиофилизированы, остаточная влажность составила не более 1,3%.

Опытный экземпляр панели стандартных образцов сывороток (8 сывороток с HBsAg и 1 здорового донора) может быть использован для стандартизации исследований по выявлению HBsAg методом иммуноферментного анализа (ИФА) и оценки специфичности и чувствительности отечественных и зарубежных ИФА тест-систем, предназначенных для выявления HBsAg в сыворотке или плазме крови человека, а также для использования в качестве стандартных позитивных контролей в тест-системах для выявления HBsAg. В процессе дальнейшей работы планируется увеличить количество образцов стандартных сывороток с различной концентрацией HBsAg до 100 штук.

При определении чувствительности тест-системы рекомендуется использовать все стандартные сыворотки, входящие в состав панели. Уровнем чувствительности тест-системы считается наименьшая концентрация панели, оцененная согласно инструкции по применению данной тест-системы как положительный образец в обоих лунках.

Препарат HBsAg в количестве, соответствующем 2 мг общего белка, в смеси с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) вводился под конъюнктиву в оба глаза; еще 2 мг белка в смеси с ПАФ вводились в подушечки задних лап.

Через 9 дней 2 мг того же белка в смеси с ПАФ вводились под конъюнктиву в оба глаза; еще 2 мг белка в смеси с ПАФ — подкожно в область лимфоузлов лопаток.

Через 9 дней 2 мг того же белка в смеси с ПАФ вводились под конъюнктиву в оба глаза; еще 2 мг белка в смеси с ПАФ — подкожно в область подколенных лимфоузлов задних лап.

Через 7 дней — пробный забор крови.

Через 90 дней — повторная иммунизация однократным внутривенным введением 4–6 мг белка.

При высоком качестве антисыворотки ее забор проводился всегда через 7 дней после последней инъекции (из краевой вен уха кролика или из вены подкрыльцовой впадины у овцы). При этом однократно отбирали у кролика 50–100 мл крови, у овцы — 300–400 мл. Забор крови повторялся через 2–3 дня и продолжался в таком режиме в течение 15–20 дней.

Полученная сыворотка лиофилизировалась или консервировалась добавлением азида натрия (до общей концентрации 0,02%) и хранилась в жидком виде при 4–8°C.

Анализ и стандартизация антисывороток. Все серии антисывороток предварительно проверялись на присутствие антигенов к HBsAg. Для этого они адсорбировались (истощались) антигенами плазмы крови экстрактов разных органов и тканей, после чего изучалась их преципитирующая способность в специфической реакции с антигеном иммунодиффузионным анализом или с помощью иммуноэлектрофореза по Р. Grabar и С.А. Williams и перекрестного иммуноэлектрофореза по С.В. Laurell.

Для сравнения специфичности и чувствительности тест-систем, разработанных на основе моноклональных анти-HBs собственного производства, использовались коммерческие анти-HBs, изготовленные фирмой «Сорбент-сервис» Россия.

В основе разрабатываемой тест-системы была положена пара моноклональных антител, первые из которых выступили в качестве подложки: анти-HBs — собственного производства — исходная концентрация 550 мг/мл и анти-HBs — «Сорбент-сервис» (клон X-12 исходная концентрация 8 мг/мл), а вторые в качестве конъюгата — меченные пероксидазой хрена SIGMA 6782, анти-HBs собственного производства исходная концентрация 500 мг/мл — и анти-HBs — «Сорбент-сервис» (клон X-7 исходная концентрация 4 мг/мл). Сорбция анти-HBs проводилась в 0,02 М боратном буфере pH 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, или просто в растворе NaCl с pH 5,5–6,0 в концентрации 5 мкг/мл. Антитела X-12 сорбировали по 105 мкл на лунку на ночь при комнатной температуре на 96 луночных планшетах MaxiSorb фирмы NUNC Дания. Для разведения конъюгата, конечная концентрация которого составила 2 мкг/мл, нами

обычно использовался фосфатно-солевой раствор с твином 20, содержащий 10 мг/мл БСА. Одним из вариантов буфера для конъюгата для увеличения специфичности тест-системы служил многокомпонентный буфер, на основе фосфатно-солевого раствора с твином 20, который содержал: 20% мочевины, 0,02% азид натрия, 0,5% козеин, 0,2% фенола, 10% иммуноглобулина крупного рогатого скота или нормальной человеческой сыворотки в той же концентрации и 0,2% нормальной мышинной сыворотки. В качестве субстратной смеси использовали стандартный раствор ТМБ на цитратном буфере. Инкубации сывороток (неразведенных) и конъюгата проводили в термостате (ТС-80) при 37°C в течение 1 часа. Для промывки использовался стандартный фосфатно-солевой буфер с твином 20. Отмывку не связавшихся антител проводили троекратно, заполняя лунки планшета на 300 мкл, используя автоматический вошер иммунологических планшетов отечественного производства МВ-350 (Технофорум, Минск). В качестве контрольных образцов использовались сыворотки крови больных вирусным гепатитом В (пациенты Витебской и Гомельской областных инфекционных больниц — 123 пациента), а также сыворотки с различной концентрацией HBsAg из панели стандартных сывороток производства Российской фирмы Вектор Бест (D-0540).

Проводилась качественная оценка результатов иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями по применению данных тест-систем. Оптическая плотность измерялась при длине волны 450 нм на автоматическом иммуноферментном анализаторе АИФ М/340.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы STATISTICA v.5.0, были применены метод вариационной статистики Фишера-Стьюдента, критерий χ^2 , непараметрический критерий Манна-Уитни.

Для модификации планшетов в качестве источников ультрафиолетового излучения применяли широко используемый облучатель бактерицидный потолочный ОБП-300 (ТУ 64-1-1445-78). В облучателе использовали две открытые газозарядные лампы низкого давления, излучающие УФ лучи (длина волны 253,7 нм).

Результаты и их обсуждение

HBV- инфекция представляет собой одну из важнейших проблем современного здравоохранения в связи с частотой распространения, неуклонным ростом заболеваемости, высоким риском трансформации в цирроз печени и развития гепатоцеллюлярной карциномы. Около 1 млн. человек умирают ежегодно от хронических заболеваний печени, включая рак и цирроз печени. Вирус гепатита В занимает второе место в мире после табакокурения как причина, вызывающая рак у человека [2]. Распространенность гепатита В широко варьирует в разных регионах земного шара. Страны Северной Америки, Западной Европы, Австралии, Новой Зеландии имеют низкий эпидемический статус в отношении гепатита В. Инфицированность в них составляет менее 20%, носителей HBsAg — менее 1%. В Восточной и Южной Европе, странах СНГ, Центральной Азии, Японии, Южной Америке инфицированность населения колеблется от 20 до 60%, а число носителей HBsAg составляет 2–7%. В странах Южной Азии, Китая, Ближнего Востока, Африки, Арктики гепатит В распространен очень широко — инфицированность составляет более 60%, а носительство — более 15%.

Создание недорогих и качественных иммуноферментных диагностических наборов, обеспечивающих высокую аналитическую чувствительность и специфичность, связано как с разработкой новых высокоэффективных иммуноферментных препаратов, так и с внедрением новых техпроцессов изготовления аналитических слоев на поверхности стрипов, а также разработкой принципиально новых иммуноферментных процессов, сокращающих диагностические процедуры (время анализа) в десятки раз.

При выборе носителя и методе связывания для конкретного объекта необходимо стремиться к максимальному сохранению им иммунологических свойств и стабильности в иммобилизованном состоянии. Важно также, чтобы носитель обладал минимальной способностью неспецифически связывать компоненты анализируемой смеси, в особенности соединение, меченное ферментом [2, 7].

Форма заболевания, его прогноз проводятся на основании комплексного учета клинических, биохимических, сероло-

гических и эпидемиологических данных. Особое значение для этиологической диагностики имеет обнаружение серологических маркеров этой инфекции, основными из которых являются HBsAg, HBeAg, анти HBc IgM, анти HBc, анти HBe и анти HBs, которые выявляются в сыворотке крови в основном иммуноферментным методом, реже в реакции пассивной гемагглютинации радио и иммунофлюоресцентным анализом. Маркером, свидетельствующим об активном размножении вируса является ДНК HBV, для определения которой используются молекулярно-биологические методы.

HBsAg, являясь основным серологическим маркером вируса гепатита В, используемым для диагностики этой инфекции, появляется в сыворотке крови через 1–2 недели после инфицирования, т.е. может быть обнаружен инкубационном периоде до появления клинических симптомов, иногда одновременно с вирусной ДНК. Концентрация HBsAg в этот период может быть очень незначительной, но в последующие сроки она существенно увеличивается вместе с подъемом активности АЛАТ и в периоде разгара болезни иногда достигает 100–500 мг в/мл крови.

В то же время появление HBsAg в крови зависит от инфицирующей дозы вируса, индивидуальных особенностей иммунной системы организма. При использовании высокочувствительных иммуноферментных тест систем, позволяющих выявить HBsAg в концентрациях 0,05–0,1 нг/мл, он обнаруживается практически у всех лиц, инфицированных HBV.

При создании иммуноферментных тест систем, в основе которых лежит реакция антиген-антитело, необходимо учитывать неоднородность популяции антител так как из литературы известно, что HBsAg это сложный антигенный комплекс, в состав которого входит несколько антигенных детерминант [4]:

«а» — общая группоспецифическая детерминанта «у» или «d», «г» или «w» — две пары аллельных или подтиповых детерминанты;

«х, f, t, n, g, k, q» — дополнительные (минорные) детерминанты.

В настоящее время известно девять основных субтипов антигена: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrg- и adrg+и

пять более редких: awt, adrw, adyw, adywt, которые определяются сочетанием антигенных детерминант.

Имеются четыре зоны земного шара, разделённые по распространению HBsAg:

Зона «V» (HBsAg/ay) — средний Восток, Иран, Пакистан, Южно-Европейские страны, Африка. Частота выявления HBsAg субтипа ay в России, Украине и Узбекистане составляет 95–98%; в Литве, Латвии, Молдове — 72–84%.

Зона «D» (HBsAg/adw) — Северные и Центральные районы Европы, Америки и Африки, Таиланд, Индонезия, Гвинея.

Зона «K» (HBsAg/adr) — Юго - Восточная Азия (Китай, Япония, Корея), Дальний Восток.

Смешанная зона — центральные зоны в Океании.

В той части Белоруссии, которая расположена ближе к России, практически в 95% случаев выявляется субтип ay, а на западных её территориях чаще встречаются варианты субтипа ad. Соответственно правильный подбор пары моноклональных анти-HBs: подложка — конъюгат — является одним из самых значимых параметров разрабатываемой тест-системы. Данный факт очень важен, так как на взаимодействие антитела с антигеном способны повлиять небольшие различия в первичной структуре молекулы последнего, а также изменение заряда и стерической конформации его последовательности. Поэтому используемые в диагностике антигены должны обладать свойствами, наиболее приближенными к свойствам нативных антигенов инфекционных агентов, которые и вызвали синтез антител. Использование моноклональных антител для создания диагностических наборов, не прошедших полное предварительное тестирование на стандартных контрольных панелях, делает возможным пропуск обнаружения некоторых мутантных вариантов HBsAg. В настоящее время в некоторых работах отмечается, что существует как минимум 66 моноклональных антител, которые могут быть использованы для конструирования ИФА тест-систем для выявления HBsAg [8].

Таким образом, используемые для создания иммуноферментных наборов моноклональные антитела должны проходить тщательное предварительное тестирование против всех известных в настоящее время вариантов антигенного комплекса, именуемого HBsAg.

В результате проведения предварительных внутрилабораторных испытаний было установлено, что чувствительность тест-системы, созданной на основе пары моноклональных анти-HBs (X 12-X 7), достигает 0,1 нг/мл при тестировании стандартов, содержащих HBsAg. Выбор для создания разрабатываемой тест-системы именно этой пары антител основан на анализе литературных данных [1, 6] и собственного опыта (обследовано 123 больных HBV-инфекцией).

В то же время недостатком разрабатываемой тест-системы является малое время удержания сорбции при хранения набора (не более двух недель). Выходом из данной ситуации, на наш взгляд, является создание варианта тест-системы с моноклональными анти-HBs для сорбции с фасовкой в отдельном флаконе, которые разводятся непосредственно перед проведением исследований, а также проведение дальнейшей работы над консервацией сорбированных планшет, для чего, в частности, нами планируется использование вакуума для упаковки сорбированных планшет и применение различных химических консервантов.

В результате проведенной работы, разработанные диагностические препараты были апробированы с использованием сывороток крови больных хроническим вирусным гепатитом В, находившихся на лечении в инфекционных стационарах Гомельской и Витебской областей.

Отобран банк HBsAg позитивных сывороток крови, в котором находится более 700 сывороток крови. Дополнительно на Гомельской областной станции переливания крови проводится отбор HBsAg позитивных сывороток крови в больших объёмах.

На основе этих банков крови изготовлены пулы сывороток, содержащих HBsAg в различных концентрациях, пулы стандартизованы на тест-системах производства фирмы Вектор Бест (Новосибирская область, п. Кольцово) и НПО «ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ» (Нижний Новгород) с использованием наборов стандартных образцов (СО) HBsAg, разработанных в соответствии с международным стандартом NIBSC code 80/549 (для HBsAg) Государственным учреждением НИИ Эпидемиологии и Микробиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь (ГУ НИИ ЭМ) с нашим участием.

На основе пулов сывороток изготовлен опытный образец панели стандартных сывороток, содержащих HBsAg в 8 различных концентрациях, плюс одна негативная по HBsAg.

Разработанный комплект НТД на диагностические препараты полностью соответствует ГОСТу РБ «Разработка и постановка на производство медицинских изделий».

Заключение

В результате проведения предварительных внутрилабораторных испытаний было установлено, что по параметрам чувствительности и специфичности тест-система, созданная нами, практически полностью соответствует коммерческим иммуноферментным тест-системам, зарегистрированным в Республике Беларусь, уточнённые данные по этим параметрам будут представлены после официальных медицинских испытаний, которые будут проводиться в соответствии с назначением Центра экспертиз и испытаний в здравоохранении Республики Беларусь.

При создании иммуноферментных тест-систем, в основе которых лежит реакция антиген-антитело, необходимо учитывать неоднородность популяции антител. Соответственно правильный подбор пары моноклональных анти-HBs: подложка — конъюгат — является одним из самых значимых параметров разрабатываемой тест-системы. Данный факт очень важен, так как на взаимодействие антитела с антигеном способны повлиять небольшие различия в первичной структуре молекулы последнего, а также изменение заряда и стерической конформации его последовательности [2, 7, 9]. Поэтому используемые в диагностике антигены должны обладать свойствами, наиболее приближенными к свойствам нативных антигенов инфекционных агентов, которые и вызвали синтез антител. Использование моноклональных антител для создания диагностических наборов, не прошедших полное предварительное тестирование на стандартных контрольных панелях, делает возможным

пропуск обнаружения некоторых мутантных вариантов HBsAg [1].

Таким образом, используемые для создания иммуноферментных наборов моноклональные антитела должны проходить тщательное предварительное тестирование против всех известных в настоящее время вариантов антигенного комплекса, именуемого HBsAg.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурков А.Н.* Методология конструирования коммерческих тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний. Дис. ... д-ра. мед. наук. — Нижний Новгород, 2001.
2. *Васильева Е.А.* Сравнительная характеристика вирусных гепатитов В и С по данным клинико-лабораторного и эпидемиологического обследования: Дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1995.
3. Вирусные гепатиты: Учебное пособие / *В.И. Роциупкин, Н.Г. Юрченко, А.А. Суздальцев, В.Ф. Четвергов.* — Самара: СГМУ, 1996. — 56 с.
4. *Дзантиев Б.Б., Егоров А.М.* // Ж. Всесоюз. хим. общ. им. Д.И. Менделеева. — 1982. — Т. 27. — № 4. — С. 442—449.
5. *Жаворонок С.В.* Клинико-прогностические особенности хронических заболеваний печени в зависимости от циркуляции маркеров инфицирования вирусами гепатитов В, С и Д // Съезд врачей-инфекционистов в г. Суздале. — М.-Киров, 1992. — Т. 1. — С. 225—227.
6. Значение обнаружения HBsAg методом иммуноферментного анализа для клинической практики. Информативность индикации HBsAg иммуноферментным анализом для клинической практики. / *Бурков А.Н., Блинова Т.В., Шарипова И.Н., Залеских Н.В., Пыренкова И.Ю., Лялина И.К., Белова Н.Г., Поздышева Л.В.* — Нижний Новгород, 2002.
7. Иммуноферментный анализ. Пер. с англ. / Под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхоффа. — М.: Мир, 1988. — 446 с.
8. Патент № 2082759 Бирагийн Арьяа [MN] Скрябин Константин Георгиевич [RU] Эльдаров Михаил Анатольевич [RU] Штамм дрожжей *saccharomycetes cerevisial*, содержащий рекомбинантную плазмиду YEP 63/AB, — продуцент производного М-белка вируса гепатита В человека.

Поступила 28.03.2005