

УДК 578.825:616.98:578.826.6

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІЗНИХ КОНСТРУКЦІЙ ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ

Ковтонюк Г. В., Шевчук В. О., Кисельова О. К., Вудмаска М. І., Ганова Л. О., Терещенко М. І., Пономаренко Н. М., Мойса Л. М., Коршун Л. М., Ніколайчук М. В., Співак М. Я.

*Порівняльний аналіз різних конструкцій імуноферментних тест-систем для діагностики простого герпесу. — Г. В. Ковтонюк, В. О. Шевчук, О. К. Кисельова, М. І. Вудмаска, Л. О. Ганова, М. І. Терещенко, Н. М. Пономаренко, Л. М. Мойса, Л. М. Коришун, М. В. Ніколайчук, М. Я. Співак. — Проведено порівняльний аналіз показників інформативності (чутливості та специфічності) імуноферментних тест-систем для діагностики антитіл класів G та M специфічних до вірусу простого герпесу виготовлених на основі очищених лізатних вірусних антигенів (Ltd. Virion) та рекомбінантних білків gG1 та gG2 (Ltd. Viral Therapeutics, JSC Diaproph-Med) з антигенними детермінантами вірусу 1 та 2 типів. Використання рекомбінантних білків замість лізатних антигенів вірусу у складі імуноферментних тест-систем для визначення специфічних IgG та IgM дозволяє не тільки зберегти чутливість, але покращити специфічність тест-систем. Необхідно підкреслити, що якісні характеристики тест-систем, розроблених на основі сконструйованих нами рекомбінантних білків, були кращими, ніж з використанням їх комерційних аналогів.*

**Ключові слова:** вірус простого герпесу 1 та 2 типів, імуноферментний аналіз, рекомбінантні антигени.

**Адреса:** АТЗТ НВК «Діапроф Мед», Київ (Україна), e-mail: galkov12@gmail.com; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Ак. Заболотного 154, 03680, м. Київ, Україна.

*Comparative analysis of different ELISA test kit constructions for diagnostics Herpes simplex virus. — G. Kovtonjuk, V. Shevchuk, O. Kiselyova, M. Vudmaska, L. Ganova, M. Tereschenko, N. Ponomarenko, L. Moysa, L. Korshun, M. Nikolaychuk, M. Spivak. — Comparative analysis of sensitivity and specificity of ELISA kits for revealing of IgG and IgM to Herpes simplex virus was performed. ELISA kits were developed using purified antigens from viral lysates (Virion Ltd.) and recombinant proteins gG1 and gG2 (Therapeutics Ltd., JSC Diaproph-Med), which contain antigenic determinants from Herpes simplex virus type 1 and 2 respectively. The use of recombinant proteins instead of antigens from viral lysates allows us save sensitivity and to improve specificity of ELISA kits for specific IgG and IgM revealing. It is necessary to stress that the quality of ELISA kits with recombinant proteins prepared in our LAB was better than that of commercial ones, if to compare an antigenic specificity.*

**Key words:** Herpes simplex virus type 1 and 2, recombinant antigens.

**Address:** JSC «Diaproph-Med», Kyiv, Ukraine; Zabolotny Institute of microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Zabolotno st., Kiev, Ukraine.

### Вступ

Простий герпес (*Herpes simplex*) – хронічне рецидивуюче захворювання, етіологічними чинниками якої є вірус простого герпесу 1 та 2 типів (ВПГ1/2), що характеризується інтенсивним розповсюдженням серед населення. За даними сероепідеміологічних досліджень антитіла до ВПГ1/2 найчастіше виявляються серед осіб віком від 30 років у 70 – 90% населення. Серед інфікованих гостра форма захворювання зустрічається тільки в 10–15% випадків, слабо виражені клінічні симптоми інфекції відзначаються у 10% хворих, решта 70% випадків становить безсимптомне вірусносіяство [2].

Різноманітність клінічних проявів простого герпесу, широке розповсюдження атипових та безсимптомних форм захворювання значно ускладнюють його діагностику. Тому в лабораторній практиці для діагностики ВПГ зазвичай використовуються серологічні методи, які виявляють специфічні антитіла в організмі як за наявності, так і при відсутності клінічних проявів захворювання [1].

Серед серологічних методів широкого розповсюдження набув метод твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), оскільки він простий у використанні, не потребує дорогого обладнання та складної попередньої обробки досліджуваного матеріалу, а також дає можливість отримати результат через 1–1,5 години [3, 6, 8].

Попереднє покоління імуноферментних тест-систем було виготовлено на основі лізатного вірусного антигену, який отримували шляхом лізису культури клітин, уражених вірусом. Даний метод отримання антигену забезпечує високу чутливість, проте не є високоспецифічним, до того ж процес виготовлення даних антигенів пов'язаний з багатьма біологічними ризиками.

Встановлено, що ВПГ1 та ВПГ2 мають відмінні типоспецифічні антигени gG1 та gG2, які зв'язані з нуклеокапсидом та ліпідною оболонкою вірусу [7, 9]. Наразі, при виробництві імуноферментних тест-систем часто використовують рекомбінантні білки – аналоги вірусних антигенів gG1 та gG2, що дає мож-

ливість зменшити кількість хибнопозитивних результатів та уникнути використання патогенного матеріалу при виробництві діагностичних тест-систем.

Мета нашої роботи полягала в порівняльному аналізі показників чутливості та специфічності імуноферментних тест-систем для діагностики антитіл класів G та M специфічних до ВПГ1/2, виготовлених на основі лізатного та рекомбінантних вірусних антигенів.

#### **Об'єкт і методи**

*Досліджувані зразки сироваток крові людини:*

– стандартні контрольні зразки: позитивний («Accurun 150 HSV IgG Positive Control») та негативний («Accurun 800 TORCH Negative Control») виробництва ВВІ (США);

– панель сироваток РТН201 («Anti-Herpes Simplex Virus types 1&2 mixed titer performance panel») виробництва ВВІ (США), яка містить 2 негативних зразка (№10, №19) та 23 – позитивних, з яких 10 – містять IgM антитіла до ВПГ2, зразок №20 має суміш антитіл класу М до ВПГ1 та ВПГ2, решта сироваток (22 зразка) містять суміш антитіл класу G до ВПГ1 та ВПГ2;

– внутрішньо-виробнича панель сироваток (ВВП, «Діапроф Мед»), що містять (16 зразків) і не містять (19 зразків) IgG антитіла до ВПГ1/2. Зразки панелі підтверджені в імуноферментних тест-системах «Herpes Simplex Virus HSV-Type 1+2 IgG-ELISA» (Ltd. Nova Tec, Німеччина) та «HSV 1/2-IgG» (Ltd. Immulite, США);

– внутрішньо-виробнича панель сироваток («Діапроф Мед»), що містять (9 зразків) і не містять (19 зразків) IgM антитіла до ВПГ1/2. Зразки панелі підтверджені в імуноферментних тест-системах «Herpes Simplex Virus HSV-Type 1+2 IgM-ELISA» («Nova Tec», Німеччина) та «HSV 1/2-IgM» («Human», Німеччина);

*Вірусні антигени:*

– очищений лізатний антиген «Herpes Simplex Virus types 1&2 (membrane)» виробництва Ltd. Virion (США);

– рекомбінантні білки gG1 та gG2, які експресовані в клітинах *Saccharomyces cerevisiae* (Ltd. Viral Therapeutics, США);

– рекомбінантні антигени gG1 та gG2 виробництва «Діапроф Мед», які отримані шляхом експресії в клітинах *Escherichia coli*. Нуклеотидна послідовність, яка кодує імунодомінантні регіони вірусних білків, підтверджена даними отриманими на секвенаторі «3100-Avant Genetic Analyzer» (США);

Молекулярну масу білків ВПГ1 та ВПГ2 визначали шляхом електрофорезу в денатуруючі умови із застосуванням 12,5% ПААГ в присутності 1% SDS за методом Лемлі [10]. У якості контролю використовували стандарти молекулярних мас білків виробництва Ltd. Fermentas (EU).

*Специфічні імуноферментні кон'югати:*

Для виявлення специфічних IgG використовували пероксидазний кон'югат на основі отриманих нами мишачих моноклональних антитіл до IgG людини.

Для виявлення специфічних IgM використовували рекомбінантні білки gG1 та gG2 мічені пероксидазою хрому.

Синтез кон'югатів проводили періодатним способом за модифікованим методом [11].

*Імуноферментні тест-системи:*

Тест-системи для діагностики імуноглобулінів класу G до ВПГ1 та ВПГ2 сконструйовані за принципом непрямого ІФА. При виготовленні імуносорбенту використовували полістиролові 96-лункові планшети виробництва Nunc (Данія), в лунки яких сорбували очищені лізатні вірусні антигени виробництва Ltd. Virion або суміш рекомбінантних білків gG1 та gG2 в 0,05М карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6). При внесенні в лунки планшета досліджуваних сироваток специфічні антитіла зв'язуються з антигенами на твердій фазі. Утворені імунні комплекси виявляли за допомогою пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до імуноглобулінів класу G людини.

Тест-системи для діагностики імуноглобулінів класу М до ВПГ1 та ВПГ2 сконструйовані в форматі IgM-«захвата». На твердій фазі сорбували отримані нами мишачі моноклональні антитіла до IgM людини, які захоплюють IgM з досліджуваного зразка. Специфічні IgM антитіла виявляли за допомогою рекомбінантних антигенів gG1 та gG2 мічених пероксидазою хрому.

В якості проявника реакції використовували хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), розведений в цитратному буфері з перекисом водню (субстрат для пероксидази). Розвиток кольорової реакції зупиняли стоп-реагентом (0,5М сірчана кислота). Визначення оптичної густини в лунках планшета проводили за допомогою спектрофотометру Labsystems Multiskan (Фінляндія) в двоххвильовому режимі 492/620 нм.

Як негативний контроль у діагностичних тест-системах використовували сироватку крові людини, що не містила антитіла класів G та M до ВПГ1/2, ВІЛ1/2, вірусу гепатиту C, *T. pallidum*, а також HBsAg вірусу гепатиту В.

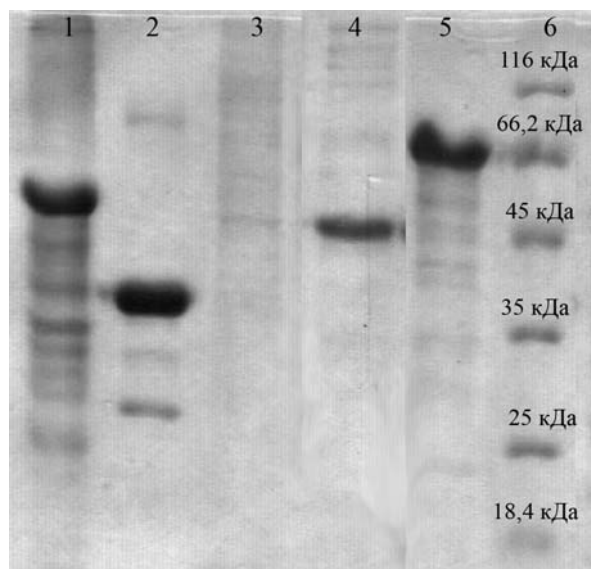
Результат вважали позитивним, якщо показник його оптичної густини (ОГ) перевищував граничне значення (cut off), яке розраховували як середнє значення трьох негативних контролів з додаванням коефіцієнту 0,2.

Кожна досліджувана сироватка тестувалась у чотирьох повторностях. Статичний аналіз отриманих результатів проводили стандартними методами на основі використання t-критерію Стьюдента [12].

#### **Результати та їх обговорення**

Порівняльну оцінку показників інформативності – чутливості та специфічності, проводили для двох різних конструкцій тест-систем, розроблених для виявлення антитіл класу G до ВПГ1/2. В одній із цих тест-систем для виготовлення імуносорбенту використовували комерційні очищені лізатні антигени вірусу простого герпесу, в іншій – рекомбінантні білки gG1 та gG2, які ми отримали з викорис-

танням генно-інженерних технологій. На рис. 1 відображені електрофоретичні профілі цих антигенів.



**Рис. 1.** Електрофореграма використаних при розробці тест-систем антигенів: треки 1 та 2 – рекомбінантні білки gG1 та gG2, отримані на підприємстві «Діапроф Мед»; 3 – очищений лізатний антиген Herpes Simplex Virus types 1&2 (membrane) виробництва «Virion Ltd.» (США); 4 та 5 – рекомбінантні білки gG1M та gG2c виробництва «Viral Therapeutics Ltd.» (США); 6 – стандартні маркери молекулярної маси білків виробництва «Fermentas» (EU).

Як свідчать результати, очищені лізатні вірусні білки (Virion Ltd.) характеризуються наявністю слабо візуалізованих гетерогенних фрагментів і розподілені в межах від 140 до 5 кДа. Молекулярна маса рекомбінантних білків gG1M та gG2c (Ltd. Viral Therapeutics) становить приблизно 45 кДа та 80 кДа відповідно, що узгоджується з їх паспортними даними. Найбільш виражена смуга отриманого нами рекомбінантного білка gG1 знаходиться на рівні 48,3 кДа, а молекулярна маса білка gG2 значно нижча, ніж у комерційного аналога – 35,4 кДа.

Як свідчать результати тестування стандартних контрольних зразків сироваток, в обох варіантах тест-систем отримано позитивний результат для позитивного контролю «Accurun 150» та негативний – для негативного контролю «Accurun 800» без наявності достовірних відмінностей (рис. 2а)

При тестуванні панелі сироваток РТН201 («ВВІ») в двох досліджуваних конструкціях тест-систем IgG антитіла до ВПГ1/2 визначено в 19 зразках (рис. 2б). В 2 позитивних сироватках (№3, 7) специфічні IgG виявлені лише в тест-системі з використанням рекомбінантних білків gG1 та gG2 у складі імуносорбенту. У сироватці №14 специфічні IgG не визначені у жодній тест-системі, як в досліджуваних нами, так і закордонного виробництва BioWhittaker, Clark, Diamedix, Gull, Incstar, Zeus (паспортні дані). Необхідно зазначити, що при використанні рекомбінантних білків порівняно з ко-

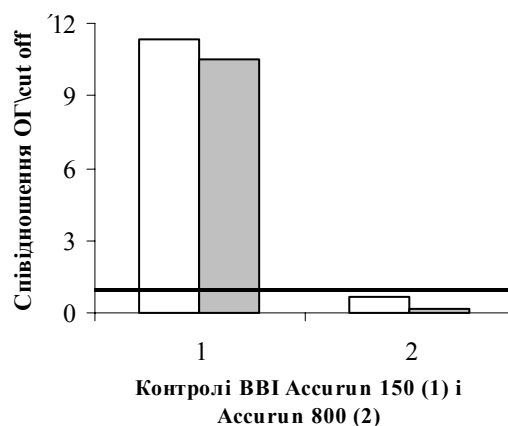
мерційними лізатними антигенами, розроблена нами тест-система виявляла специфічні IgG з більшим значенням ОГ/cut off в 13 сироватках і тільки в 2 зразках (№17, 22) – з меншим ( $p < 0,05$ ).

Співвідношення ОГ/cut off при тестуванні 4 сироваток панелі (№1, 5, 16, 25) в досліджуваних тест-системах не мав суттєвих відмінностей. Зразки панелі, які не містять IgG до ВПГ1/2, в обох досліджених конструкціях тест-систем визначено негативними.

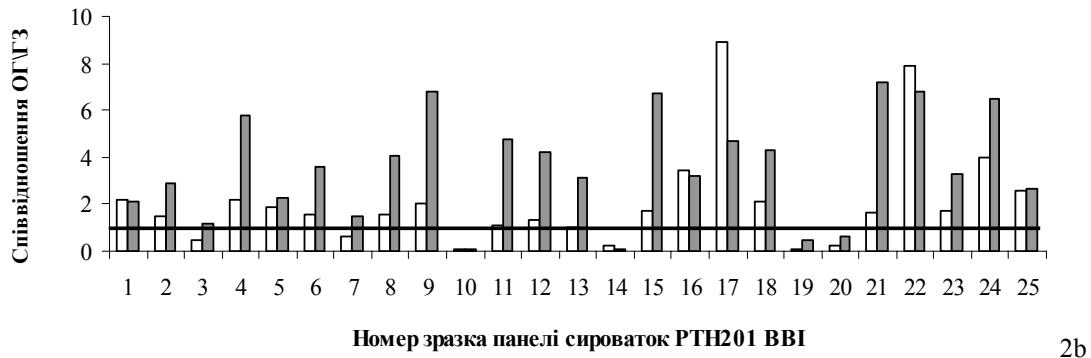
При тестуванні ВВП позитивних та негативних сироваток з використанням досліджуваних тест-систем, специфічні IgG антитіла виявляли у всіх 16 зразках, які їх містять (рис. 2с). При цьому для 13 зразків сироваток показник ОГ/cut off в тест-системі з використанням рекомбінантних білків gG1 та gG2 був достовірно вищим ( $p < 0,05$ ). При тестуванні 19 негативних зразків панелі специфічні антитіла не виявлялися у жодній із тест-систем, однак, слід зазначити, що у цьому випадку середнє значення співвідношення ОГ/cut off було меншим в тест-системі з імуносорбентом на основі рекомбінантних білків ( $p < 0,05$ ).

Порівняльні результати тестування зразків панелі РТН201 в тест-системах для діагностики IgM антитіл до ВПГ1/2, виготовлених на основі комерційних та отриманих нами рекомбінантних антигенів, наведено на рис. 3а.

Отримані дані свідчать про те, що всі 10 сироваток, які містять специфічні IgM, були визначені даними тест-системами позитивними. При цьому значення ОГ/cut off при тестуванні 5 зразків не мало достовірної відмінності. Встановлено, що при застосуванні рекомбінантних білків gG1 та gG2 у складі пероксидазного кон'югату тест-система визначала IgM антитіла до ВПГ1/2 з більшим значенням ОГ/cut off в 4 позитивних сироватках (№6, 13, 16, 22) і тільки в одному зразку (№3) – з меншим, ніж при використанні комерційних рекомбінантних білків ( $p < 0,05$ ).



2а

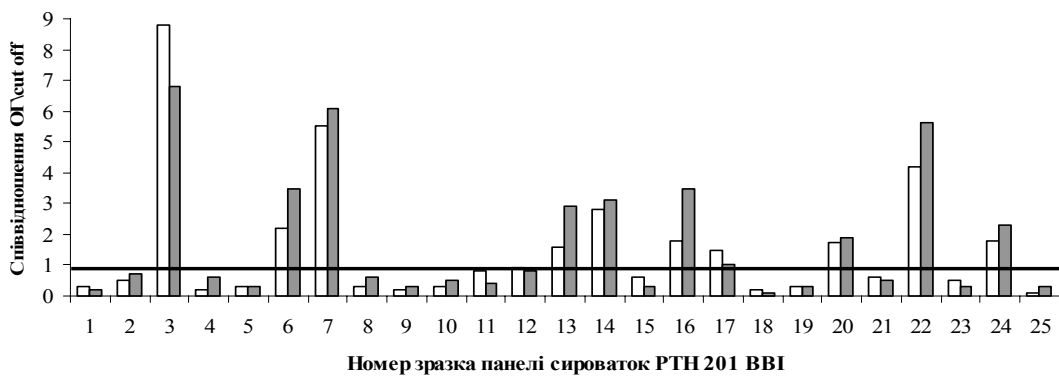


2b

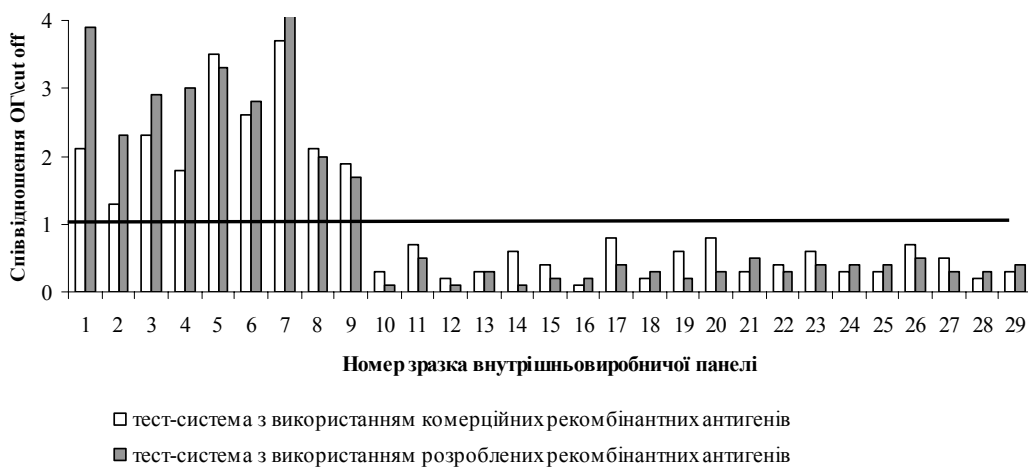


2c

**Рис. 2 (а, b, c).** Результати тестування стандартних контролей ВВІ (а), панелі сироваток РТН201 ВВІ (b) та ВВП (c) у тест-системах для визначення IgG антитіл до ВПГ1/2. Горизонтальна пряма показує граничне значення.



3a



3b

**Рис. 3 (а, b).** Результати тестування панелі сироваток РТН201 ВВІ (а) та ВВП (b) у тест-системах для визначення IgM антитіл до ВПГ1/2. Горизонтальна пряма показує граничне значення.

При порівняльному тестуванні зразків позитивних та негативних сироваток ВВП з використанням цих двох тест-систем встановлено, що всі 9 зразків панелі, які містять специфічні IgM, визначені позитивними, а в 19 негативних сироватках IgM антитіла до ВВП1/2 не визначені (рис. 3b). При цьому показник співвідношення ОГ/cut off при тестуванні 5 позитивних зразків не мав достовірної різниці, а при аналізі 4 зразків це значення було вищим у тест-системі з використанням наших рекомбінантних білків ( $p < 0,05$ ). При тестуванні негативних сироваток показник ОГ/cut off для більшості сироваток був співставним, але для 4 зразків (№ 14, 17, 19, 20) він мав менше значення при використанні тест-системи, розробленої на основі отриманих нами рекомбінантних білків ( $p < 0,05$ ).

## Висновки

Таким чином, проведене нами порівняльне дослідження із використанням антигенів різного походження у складі імуноферментних тест-систем для виявлення імуноглобулінів класу G та класу M до вірусу простого герпесу серотипів 1 та 2 свідчить про те, що застосування рекомбінантних білків замість очищених лізатних антигенів забезпечує високу чутливість та специфічність діагностичної тест-системи. Отримані на підприємстві НВК «Діапроф Мед» рекомбінантні білки gG-1 та gG-2 – аналоги природних антигенів вірусу за своїми імунохімічними властивостями повністю відповідають зарубіжним комерційним білкам gG1M та gG2c, що дозволяє використовувати їх у виробництві вітчизняних імуноферментних тест-систем для серодіагностики ВВП1/2.

1. Казимирчук В.Е., Мальцев Д.В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека – К.: Феникс, 2009. – 352 с.
2. Куцак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. – Кольцово, 2005. – 84 с.
3. Снівак М.Я. Практичний посібник з імуноферментного аналізу. К. Полімед 2005 – 63 с.
4. Ashley R.L. Performance and use of HSV type-specific serology test kits // Herpes. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 38–45.
5. Burbelo P.D., Hoshino Y., Leahy H., Krogmann T., Hornung R.L., Iadarola M.J., Cohen J.L. Serological diagnosis of human herpes simplex virus type 1 and 2 infections by luciferase immunoprecipitation system assay // Clinical and Vaccine Immunology. – 2009. – Vol.16, №3. – P. 366–371.
6. Clayton A.L., Roberts C., Dr. Chantler S.M., Godley M., Best J.M. Herpes Simplex Virus Detection by ELISA: Effect of Enzyme Amplification, Nature of Lesion Sampled and Specimen Treatment // Journal of Medical Virology. – 2005. – Vol. 20, № 1, P. 89–97.
7. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2007. – Vol. 57, № 5. – 723 p.
8. Leyland B., Kennedy M.R., Wimberly Y.H., Levine B.J., Cherpes T.L. Serologic detection of herpes simplex virus type 2 antibodies among pregnant women using a point-of-care test from Focus Diagnostics // Journal of Clinical Virology. – 2009. – Vol. 44, № 2. – P. 125–128.
9. Scheper T., Saschenbrecker S., Steinhagen K., Sauerbrei A., Suer W., Meyer W., Schlumberger W., Wandinger K.P. The glycoproteins C and G are equivalent target antigens for the determination of herpes simplex virus type 1-specific antibodies // Journal of Virological Methods. – 2010. – Vol. 166, № 1–2. – P. 42–47.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
11. Tijssen P., Kustak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates for enzyme immunoassays // Analytical Biochemistry. – 1984. – Vol. 136, № 2. – P. 451–457.
12. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel – К.: Морион, 2001. – 407с.

Отримано: 2 листопада 2010 р.  
Прийнято до друку: 25 січня 2011 р.