

**Г.В. Ковтонюк<sup>1</sup>, Л.М. Коршун<sup>1</sup>, В.О. Шевчук<sup>2</sup>, О.К. Кисельова<sup>1</sup>, М.І. Вудмаска<sup>1</sup>,  
Л.О. Ганова<sup>1,2</sup>, М.І. Терещенко<sup>1</sup>, Л.М. Мойса<sup>1</sup>, М.Я. Співак<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ПрАт «НВК «Діапроф-Мед»

<sup>2</sup> Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

## **ІМУНОФЕРМЕНТНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СЕРОДІАГНОСТИКИ ВІРУСУ ГЕРПЕСУ 2 ТИПУ**

*На основі рекомбінантного білка gG2 (JSC Diaproph-Med) сконструйовано імуноферментну тест-систему для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу герпесу 2 типу з визначенням їх авідності. За допомогою розробленої тест-системи досліджено розподіл специфічних антитіл із різними індексами авідності серед донорської популяції. Розроблену тест-систему можливо використовувати для підтвердження як первинної інфекції, так і для диференціації первинного захворювання від хронічного процесу та реактивації вірусу. Тому розроблена нами тест-система може бути додатковим методом діагностики герпетичної інфекції.*

*Ключові слова:* вірус простого герпесу 2 типу, імуноферментний аналіз, рекомбінантні антигени, авідність антитіл.

Вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ2) є етіологічним чинником більшості випадків хронічного та рецидивуючого генітального герпесу. ВПГ2 – ДНК-вмісний вірус, що належить до підродини альфа-герпесвірусів. За даними ВОЗ інфікованими ВПГ2 є 20 % населення планети [1]. Для герпетичної інфекції характерні горизонтальний (від хворого до здорового) та вертикальний (від матері до плоду) способи передачі. Перший може здійснюватися повітряно-крапельним, статевим та парентеральним шляхами, другий є результатом внутрішньоутробного трансплацентарного інфікування, що призводить до різноманітних патологій вагітності і вроджених патологій плоду. Також існує велика імовірність інфікування плоду безпосередньо під час пологів при контакті з ураженими оболонками статевого тракту матері [2]. Незважаючи на високу гомологічність до спорідненого ВПГ1, вірус простого герпесу 2 типу є більш небезпечним, оскільки має більш виражену тропність до епітеліоцитів слизових оболонок статевого тракту, його тривала персистенція може викликати онкогенну трансформацію клітин. Інфекція, зумовлена ВПГ2, порівняно з ВПГ1, характеризується частішими рецидивами та більш складними патологіями, зокрема є причиною невиношування вагітності та розвитку вроджених вад плоду [3, 4].

Діагностичне значення при первинному інфікуванні ВПГ2 мають IgM, які починають виявлятися в крові на 4-6 добу після інфікування та досягають максимального значення на 15-20 добу. Починаючи з 10-14 доби спостерігається продукція специфічних IgG, які персистують в організмі протягом всього життя [5]. Тому серологічні методи дозволяють діагностувати захворювання, як в період активації вірусу, так і під час латентного перебігу інфекції. Антитіла класу M до ВПГ2 рееструються в організмі не тільки при первинній інфекції, але також при реактивації вірусу та реінфекції. У зв'язку з чим, при встановленні діагнозу первинного захворювання обов'язковим є визначення авідності специфічних імуноглобулінів класу G [6, 7]. Авідність є показником спорідненості активного центру антитіла з антигенними детермінантами збудника, і є пропорційною ступеню міцності утвореного імунного комплексу. Специфічні IgG з низькою авідністю виявляються лише на ранніх етапах первинної герпетичної інфекції, що дає змогу диференціювати її від хронічної рецидивуючої хвороби [8].

В серодіагностиці ВПГ2 перспективним напрямком є використання різноманітних конструкцій твердофазного ІФА. Використання типоспецифічного рекомбінантного білка gG2 дозволяє відокремити герпетичну інфекцію, викликану ВПГ2, від захворювань, зумовлених подібним вірусом ВПГ1, що має суттєве прогностичне значення та впливає на стратегію лікування [7, 9].

Метою роботи було розробити імуноферментну тест-систему для виявлення імуноглобулінів класу G до ВПГ2 з визначенням їх індексу авідності та дослідити можливості її використання в лабораторній практиці для діагностики ВПГ2.

**Матеріали і методи.** Досліджували зразки сироваток крові людини. 510 зразків сироваток крові донорів, які надано обласною станцією переливання крові Київської області. Всі зраз-

ки попередньо перевірено тест-системою «ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ 2-G» (Н.Новгород, Росія) на наявність специфічних антитіл до ВПГ2. 414 зразків підтверджено як негативні, 96 – як позитивні.

*Експресуючий вектор і культура бактерій.* При конструюванні продуцента рекомбінантного білка gG2HSV2 використовували плазмідний вектор pET28a (Novagen, США) і клітинну систему реципієнтного штаму *Escherichia coli* BL21(DE3). Для отримання вставки ДНК, що кодує фрагменти імунодомінантних ділянок глікопротеїну G вірусу простого герпесу 2 типу, використовували набори попарно-компліментарних олігонуклеотидів, які після гібридизації зшивали між собою за допомогою ДНК-лігази фагу T4.

*Рекомбінантний білок gG2 HSV2.* Рекомбінантний білок gG2 HSV2 отримано шляхом експресії в клітинах *Escherichia coli*. Нуклеотидну послідовність, яка кодує імунодомінантні регіони вірусних білків, було підтверджено нами на секвенаторі «3100-Avant Genetic Analyzer» (США).

Хроматографічну очистку рекомбінантного білка здійснювали за допомогою хроматографічної системи «Bio-Rad» (США) із застосуванням методів іммобілізованої метал-афінної хроматографії (IMAX) з використанням сорбенту IDA-toyoperl (TOSOH, Японія), попередньо активованим іонами нікелю згідно з інструкцією фірми-виробника. Елюцію білка проводили способом ступінчастої хроматографії з різними концентраціями імідазолу (40-200 мМ). Концентрацію білка вимірювали біуретовим методом, а якість очистки оцінювали за допомогою електрофорезу в 12 % ПААГ-SDS за методом Леммлі [10].

*Специфічний імуоферментний кон'югат.* Для виявлення специфічних IgG використовували пероксидазний кон'югат на основі отриманих нами мишачих моноклональних антитіл до IgG людини. Синтез кон'югатів проводили періодатним способом за модифікованим методом Тіссена [11].

*Імуоферментна тест-система.* Імуоферментну тест-систему для визначення імуноглобулінів класу G до ВПГ2 сконструйовано в форматі непрямого ІФА. В якості твердої фази використовували полістиролові 96-лункові планшети виробництва «Nunc» (Данія), в лунки яких сорбували очищений рекомбінантний білок gG2 HSV2 в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6).

Для розведення досліджуваних сироваток та кон'югату використовували фосфатний буфер із додаванням молока та твіну 20 як компоненти, які блокують неспецифічні сигнали.

Постановку ІФА проводили у два етапи. На першому етапі досліджувані сироватки розводили 1:50, вносили в лунки імуносорбенту по 100 мкл і інкубували 60' при 37°C. При внесенні в лунки планшета зразків сироваток антитіла до ВПГ2 зв'язувались із відповідними антигенами на твердій фазі.

Для визначення індексу авідності досліджувану позитивну сироватку інкубували в двох паралельних лунках імуносорбенту, потім одну з них промивали 6 раз фосфатним буфером із додаванням тритону X100 (ФБ). Дисоціюючий розчин (ДР), який спричинює руйнування комплексів антигену з низькоавідними антитілами, вносили в іншу паралельну лунку в об'ємі 150 мкл, інкубували 10' при 25°C і промивали 4 рази ФБ.

На другому етапі ІФА утворені імунні комплекси виявляли за допомогою пероксидазного кон'югату на основі моноклональних антитіл до IgG людини, 100 мкл якого інкубували в лунках імуносорбенту 30' при 37°C. По закінченню інкубації проводили відмивання всіх лунок 6 разів ФБ.

Як проявник реакції використовували 0,03 % 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, розведений в цитратному буфері, який містить 0,016 % перекис водню. Розвиток кольорової реакції зупиняли 0,5 М сірчаною кислотою. Визначення оптичної густини в лунках планшета проводили за допомогою спектрофотометру Labsystems Multiskan (Фінляндія) в двоххвильовому режимі 492/620 нм.

При обліку результатів аналізу використовували величину граничного значення (cut off), яку розраховували за формулою:

$$\text{cut off} = \text{ОГ срК}^- + 0,2,$$

де ОГ срК<sup>-</sup> – є середнім значенням оптичної густини трьох негативних контролів.

Як негативний контроль в тест-системі використовували сироватку крові людини, що не містила антитіла класів G та M до ВПГ1/2, ВЛП1/2, вірусу гепатиту С, *Treponema pallidum*, а також HBsAg вірусу гепатиту В.

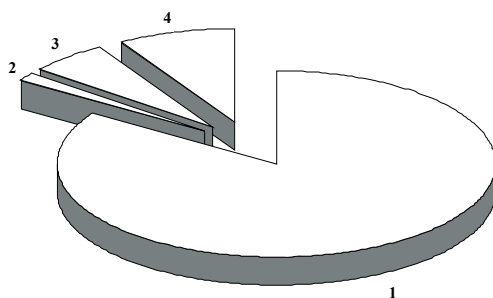
Результат вважали позитивним, якщо оптична густина (ОГ) зразка в лунці перевищувала граничне значення, негативним – якщо ОГ зразка була менше граничного значення.

Індекс авідності розраховували як відношення оптичної густини, отриманої при виявленні специфічних антитіл у присутності дисоціюючого агенту, до оптичної густини, отриманої в результаті аналізу даного зразка без обробки дисоціюючим розчином.

Якщо індекс авідності був менше 30 % вважали, що сироватка містить низькоавідні антитіла, більше 60 % – високоавідні, в діапазоні від 30 % до 60 % – середній рівень авідності антитіл.

Кожна досліджувана сироватка тестувалась у чотирьох повторях. Обробка отриманих результатів проводилась з урахуванням критерію Стьюдента [12].

**Результати і їх обговорення.** Для визначення якісних характеристик розробленої тест-системи, призначеної для виявлення IgG антитіл до ВПГ2, досліджено 510 сироваток крові донорів, наданих обласною станцією переливання крові. Отримані результати наведено на рис. 1. Серед аналізованих зразків сироваток крові донорів у 96 (18,8 %) виявлено специфічні імуноглобуліни класу G, а решта 414 (81,2 %) – були серонегативними. Аналогічні результати було отримано при попередньому тестуванні даних зразків в тест-системі «ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ 2-Г» (Н.Новгород, Росія). Ці дані відповідають розповсюдженості вірусу 2 типу серед населення в країнах східної Європи [13].



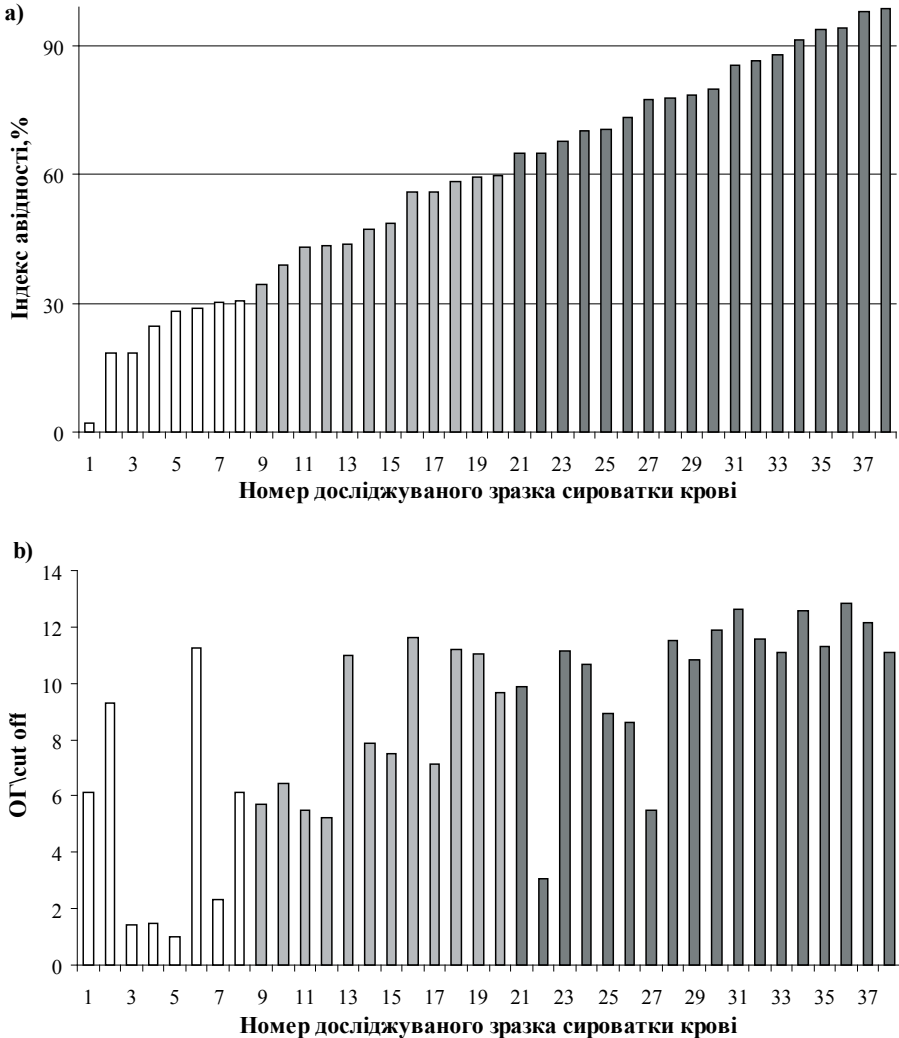
**Рис. 1. Розподіл антитіл класу G, специфічних до ВПГ2, серед донорів, сироватки яких:**  
**а) не містять антитіла до ВПГ2 (1); б) містять специфічні антитіла з низьким індексом авідності (2); з середнім індексом авідності (3); з високим індексом авідності (4).**

Визначення індексу авідності специфічних IgG антитіл базується на властивості зв'язку антиген-антитіло руйнуватися під впливом дисоціюючого розчину. Міцність імунного комплексу визначається ступенем спорідненості активного центру антитіла з антигенними детермінантами вірусу, що залежить від тривалості та продуктивності захворювання.

В наших дослідженнях при тестуванні донорів за допомогою розробленої тест-системи антитіла класу G з низьким індексом авідності – до 30 % – виявлено у 8 серопозитивних осіб (8,3 %), що вказує на первинне інфікування ВПГ2: активні центри антитіл в процесі імунної відповіді ще не набули високого ступеню спорідненості до антигену, оскільки контакт із вірусом відбувся порівняно недавно. Специфічні IgG з високим індексом авідності – більше 30 %, виявлено у 88 серопозитивних донорів (91,7 %), що вказує на інфекцію, перенесену раніше. В межах останньої групи донорів можна виокремити підгрупу з 53 осіб (55,2 %), у яких індекс авідності специфічних IgG становив 60-100 %. Такі показники можуть свідчити про пізню стадію первинної інфекції або інфекцію, перенесену в минулому. Середній індекс авідності 30-60 %, який спостерігається у 35 осіб (36 %), можна розглядати як перехідний етап розвитку імунної відповіді, а саме, процес формування специфічності активного цент-

ру антитіл [14]. Відомо, що динаміка авідності імуноглобулінів залежить від дози антигену. При низькому вірусному навантаженні відбувається більш швидке зростання авідності, тоді як велика кількість вірусу призводить до більш повільного зростання авідності [15]. Таким чином, низькоавідні антитіла продукуються протягом першої стадії інфекції, коли вміст антигенів високий. Також слід зазначити, що тривалість періоду циркуляції в організмі низько- та середньоавідних антитіл може бути зумовлена і індивідуальними особливостями функціонування імунної системи, тому остаточний висновок та інтерпретацію отриманих результатів можна сформулювати лише після відстеження динаміки кількості та індексу авідності IgG до ВПГ2.

Проведено дослідження взаємозв'язку між кількістю та значенням індексу авідності специфічних антитіл в 38 сироватках крові донорів (рис. 2).



**Рис. 2.** Результати дослідження взаємозв'язку між індексом авідності (а) та рівнем (б) антитіл класу G, специфічних до ВПГ2, в сироватках крові донорів.

**Примітка:** різним кольором виділено групи зразків що містять антитіла з:

□ – низьким;   ■ – середнім;   ■ – високим індексом авідності.

На рис. 2, б результати наведено у співвідношенні оптичної густини кожного зразка до граничного значення (OG/cut off), яке є пропорційним кількості специфічних антитіл у даному зразку.

Серед 18 досліджених сироваток із високоавідними IgG (47,5%) до ВПГ2 більшість (16 зразків) мала високий рівень специфічних антитіл. У даній групі зразків тільки у 2 сироваток кількість специфічних антитіл значно нижче, хоча їх функціональні центри є добре сформованими і високоспецифічними.

У групі сироваток із середньоавідними специфічними IgG (12 зразків, 31,5 %) високий рівень антитіл до ВПГ2 встановлено в 7 зразках, у 5 – порівняно нижче. Це може бути пов'язано з індивідуальними особливостями імунної відповіді, яка зумовлює високу спорідненість специфічних антитіл до антигену при порівняно невеликій їх кількості.

Серед досліджених сироваток 8 зразків (21 %) містили специфічні IgG антитіла з низькою авідністю. Серед них у 4 зразків відмічено також низький рівень антитіл до ВПГ2, що вказує на початкові стадії імунної відповіді. Решта 4 сироватки мали досить високий рівень специфічних антитіл, проте їх активні центри до антигенних епітопів gG2 є недостатньо сформованими і, відповідно, низькоавідними. А отже висока кількість специфічних антитіл класу G не завжди корелює з їх індексом авідності.

Відомо [6], що при первинній інфекції наявність тільки антитіл класу IgM або одночасної їх присутності з низькоавідними IgG вказує на нещодавній контакт з ВПГ2 та початок первинної імунної відповіді. Подальший розвиток інфекції супроводжується появою специфічних високоавідних антитіл IgG та наростанням їх титрів. Реактивація вірусу також викликає короточасну появу специфічних IgM, проте наявність високоавідних IgG в даному випадку дозволяє диференціювати повторну інфекцію. Виявлення низькоавідних IgG при відсутності специфічних IgM вказує на завершальну фазу гострого періоду захворювання. Але в такому випадку для підтвердження діагнозу первинної інфекції необхідно відстежувати динаміку кількості IgG та зростання їх авідності. Виявлення специфічних високоавідних IgG при відсутності IgM характерно для пізніх стадій імунної відповіді і може вказувати на захворювання, перенесене в минулому. Отже, визначення індексу авідності специфічних антитіл, так само як і визначення IgM та IgG, може бути критерієм оцінки тривалості інфекційного процесу.

Таким чином, розроблена нами тест-система для визначення антитіл до ВПГ2 з визначенням індексу їх авідності дає можливість встановити тривалість перебігу та стадію інфекційного процесу, що може бути вирішальним фактором при виборі стратегії лікування. А отже, використання в лабораторній практиці даної тест-системи є доцільним та забезпечує поглиблену діагностику ВПГ2.

Робота була проведена в рамках наукового проекту ДЗ 492-2011 «Розробка, створення та випробування композитних нанобіоматеріалів на основі наночастинок діоксиду церію» на замовлення Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України.

*Г.В. Ковтонюк<sup>1</sup>, Л.Н. Коршун<sup>1</sup>, В.А. Шевчук<sup>2</sup>, Е.К. Киселёва<sup>1</sup>, М.И. Вудмаска<sup>1</sup>,  
Л.А. Ганова<sup>1,2</sup>, М.И. Терещенко<sup>1</sup>, Л.Н. Мойса<sup>1</sup>, Н.Я. Спивак<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ЧАО «НПК «Діапроф-Мед»

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

## **ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕРПЕСА 2 ТИПА**

### **Резюме**

На основе рекомбинантного белка gG2 (ЧАО «НПК «Діапроф-Мед») сконструировано иммуноферментную тест-систему для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса 2 типа с определением их авидности. С помощью разработанной тест-системы исследовано распределение специфических антител с разными индексами авидности среди донорской популяции. Разработанную тест-систему можно использовать для подтверждения, как первичной инфекции, так и для дифференциации первичного заболевания от хронического процесса и реактивации вируса. Поэтому, разработанная нами тест-система может быть дополнительным методом для диагностики герпетической инфекции.

Ключевые слова: вирус простого герпеса 2 типа, иммуноферментный анализ, рекомбинантные антигены, авидность антител.

## **ELISA TEST-KIT FOR HERPES 2 SERODIAGNOSIS**

### **S u m m a r y**

To reveal *Herpes simplex virus 2* specific IgG and to determine their avidity the ELISA test-kit was constructed using recombinant protein gG2 (PSC SPC Diaphroph-Med). Using this test-kit the distribution of specific antibodies with different avidity indexes was investigated in practically healthy donor samples. It is possible to use the mentioned ELISA test-kit for confirmation of primary infection, and also for differentiation of primary infection, chronic disease and virus reactivation. Thus, this ELISA test-kit could be an additional tool in herpetic infection diagnosis.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е у в о р д с:** *Herpes simplex virus*, ELISA test-kit, herpetic infection diagnosis.

**Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Kovtonyuk G.V., *PSC SPC Diaphroph-Med*.

1. *Марівський В.Ф., Руденко А.О., Щербинська А.М.* Инфекционные болезни в Украине на рубеже двух столетий. //Современные инфекции. – 1999. – №2. – С.18–23.
2. *Кицак В.Я.* Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. – Кольцово, 2005. – 84 с.
3. *Казимирчук В.Е., Мальцев Д.В.* Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. – К.: Феникс, 2009. – 352 с.
4. *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. // J. Clinical Virology. – 2009. – **44**, N 2. – P. 125–128.
5. *Slomka M.J.* Seroepidemiology and control of genital herpes: the value of type specific antibodies to herpes simplex virus. // Commun. Dis. Rep. CDR Rev. – 1996. – **1**, N6(3). – P. 41–45.
6. *Brown E.L., Morrow R., Krantz E.M.* Maternal herpes simplex virus antibody avidity and risk of neonatal herpes. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2006. – **195**(1). – P. 4–6.
7. *Morrow R.A., Friedrich D., Krantz E., Wald A.* Development and use of a type-specific antibody avidity test based on herpes simplex virus type 2 glycoprotein G. // Sex Transm Dis. – 2004. – **31**(8). – P. 508– 515.
8. *Hashido M., Inouye S., Kawana T.* Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a herpes simplex virus-specific immunoglobulin G avidity assay. // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – **35**, N 7. – P.1766–1768.
9. *Manservigi R., Cassai E.* The glycoproteins of the human herpesviruses. // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 1991. – P. 81–95.
10. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **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. – **136**, N 2. – P. 451. – 457.
12. *Ланац С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel – К.: Морион, 2001. – 407с.
13. *Corey L.* Challenges in genital herpes simplex virus management. // The Journal of Infectious Diseases. – 2002. – **15**;186. – Suppl 1. – P. 29–33.
14. *Скок М.В.* Основи імунології. Курс лекцій. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 152с.
15. *Meyers R.A.* Immunology: from Cell Biology to Disease. – Wiley-VCH, 2007. – 435p.

Отримано 06.04.2011