

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Разработка способа выявления специфических антител к белку E вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа

Кривошеина Е.И.¹, Карташов М.Ю.^{1,2}, Найденова Е.В.³, Ушкаленко Н.Д.¹, Пьянков С.А.¹, Терновой В.А.¹, Локтев В.Б.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, г. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Минобрнауки России, 630090, г. Новосибирск, Россия;

³ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов, Россия

Введение. Жёлтая лихорадка (ЖЛ) остаётся одной из самых распространённых природно-очаговых инфекционных болезней в мире. В связи с возрастающим туристическим потоком в страны, эндемичные по ЖЛ, обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus*, являющихся основными переносчиками вируса ЖЛ (ВЖЛ), и тем фактом, что в медицинских учреждениях нашей страны можно получить живую аттенуированную вакцину против ЖЛ, но нет возможности оценки эффективности вакцинации, возникает вопрос о разработке и внедрении в практику диагностических наборов для выявления антител к возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель работы – разработка способа выявления специфических антител класса IgG к белку E ВЖЛ методом ИФА и оценка его диагностических характеристик.

Материалы и методы. Методом обратной транскрипции на матрице РНК ВЖЛ, выделенного на клеточной культуре *Aedes albopictus* clone C6/36, синтезирована специфичная кДНК и амплифицирован участок генома белка E ВЖЛ, который был клонирован в плазмиду pET160 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный фрагмент гена использовали в качестве ДНК-матрицы для создания рекомбинантного аналога третьего домена белка E ВЖЛ в клетках *Escherichia coli* (BL-21(DE3)). Далее произведена оценка иммуногенности полученного антигена и оптимизация условий анализа.

Результаты. Определены оптимальные условия наработки полученного рекомбинантного белка E ВЖЛ, подтверждена его специфичность иммунологическими методами (вестерн-блоттинг и ИФА), подобраны сорбционные буферы и блокирующие растворы, проведён анализ чувствительности и специфичности рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ.

Заключение. Был разработан способ выявления специфических антител класса IgG к белку E ВЖЛ методом ИФА. Данный диагностический набор может использоваться как для изучения протективных свойств вакцины против ЖЛ, так и для выявления завозных случаев инфекции на неэндемичных территориях.

Ключевые слова: вирус жёлтой лихорадки; специфические антитела; диагностика жёлтой лихорадки; белок E флавивирусов; рекомбинантные белки; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А., Терновой В.А., Локтев В.Б. Разработка способа выявления специфических антител к белку E вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 341-350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора, 630559, г. Кольцово, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Участие авторов: Кривошеина Е.И. – планирование, организация и проведение исследований, анализ литературных данных, оформление результатов, написание статьи; Карташов М.Ю. – организация и планирование исследований, оформление результатов и иллюстраций, статистическая обработка данных, написание статьи; Найденова Е.В. – организация и проведение исследований, написание статьи; Ушкаленко Н.Д. – проведение исследований; Пьянков С.А. – проведение исследований; Терновой В.А. – руководство исследованиями; Локтев В.Б. – общее руководство работой.

Финансирование: Исследования проводились в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации № 2985-р от 14 ноября 2020 г. о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Благодарность: Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе образцов биологического материала руководству и сотрудникам лаборатории вирусных геморрагических лихорадок г. Конакри (Гвинейская Республика).

Конфликт интересов: Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Этическое утверждение: Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования сывороток крови жителей Гвинейской Республики одобрен Этическим комитетом Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

Поступила 10.06.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immunoassay

Ekaterina I. Krivosheina¹, Mikhail Yu. Kartashov^{1,2}, Ekaterina V. Naidenova³,
Nikita D. Ushkalenko¹, Stepan A. Pyankov¹, Vladimir A. Ternovoi¹, Valery B. Loktev¹

¹FSSI State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³FSSI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Saratov, Russia

Introduction. Yellow fever (YF) remains one of the most common natural focal infectious diseases in the world. In connection with the increasing tourist flow to countries endemic for YF, the discovery of stable populations of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* which are the main vectors of the yellow fever virus (YFV), in the southern regions of Russia, and the fact that in medical institutions in our country it is possible to obtain a live attenuated vaccine against YF, but there is no way to evaluate the effectiveness of vaccination, the question arises of the development and implementation of diagnostic kits for detecting antibodies (AB) to the pathogen by enzyme immunoassay (ELISA).

The aim of this study was to develop a method for detecting specific IgG antibodies to the E protein of YFV by ELISA and assessing its diagnostic characteristics.

Materials and methods. A specific cDNA was synthesized by reverse transcription on an RNA template of YFV isolated on a cell culture of *Aedes albopictus* clone C6/36, and a fragment of the genome coding the YFV E protein was amplified and subsequently cloned into the plasmid pET160 (Thermo Fisher Scientific, USA). The resulting gene fragment was used as a DNA template to obtain a recombinant analog of the third domain of the YFV E protein in *Escherichia coli* cells (BL-21(DE3)). Next, the immunogenicity of the obtained antigen was evaluated and the analysis conditions were optimized.

Results. The optimal conditions for the production of the obtained recombinant E protein of YFV were determined, its specificity was confirmed by immunological methods (Western blot and ELISA), sorption buffers and blocking solutions were selected, and sensitivity and specificity of detection of antibodies to YFV using the recombinant antigen were assessed.

Conclusion. A method for the detection of specific IgG antibodies to the YFV E protein by ELISA was developed. This diagnostic kit can be used both to study the protective properties of the YF vaccine and to detect imported cases of infection in non-endemic areas.

Keywords: yellow fever virus; specific antibodies; yellow fever diagnostics; flavivirus E protein; recombinant proteins; enzyme immunoassay

For citation: Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immunoassay. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 341-350 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

For correspondence: Mikhail Yu. Kartashov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Contribution: Krivosheina E.I. – planning, organization and conduct of research, analysis of literature data, presentation of results, writing an article; Kartashov M.Yu. – organization and planning of research, presentation of results and illustrations, statistical processing of data, writing an article.

Naidenova E.V. – organizing and conducting research, writing an article; Ushkalenko N.D. – conducting research; Pyankov S.A. – conducting research; Ternovoi V.A. – research management; Loktev V.B. – general guidance.

Information about the authors:

Krivosheina E.I., <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Ushkalenko N.D., <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

Pyankov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>

Ternovoi V.A., <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Funding. The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation No. 2985-r of November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Republic of Guinea (protocol No. 129/CNERS/16 of August 31, 2015).

Received 10 June 2022
Accepted 11 August 2022
Published 31 August 2022

Введение

Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – острая природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [1–4], которым является одноименный вирус, относящийся к семейству *Flaviviridae*. Территориями, где выявлена циркуляция вируса ЖЛ (ВЖЛ), являются регионы Африки, расположенные к югу от Сахары, а также Центральной и Южной Америки. Основные переносчики возбудителя – комары рода *Aedes*, в основном *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, обитают как на эндемичных территориях (Африка и Южная Америка), так и в регионах Европы с тёплым климатом [5].

Специалистами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) разработана стратегия по ликвидации эпидемий ЖЛ (The Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE)), которая применяется и поддерживается в 40 странах Африки, Южной и Северной Америки. Целью создания такой программы являются эпидемиологический контроль за данной инфекцией и массовая вакцинация населения, проживающего в поражённых районах, в которой, по прогнозам, к 2026 г. примут участие более 1 млрд человек. Ежегодно ВОЗ публикует перечень стран, где существует риск возникновения вспышек ЖЛ, а также список государств, при въезде в которые требуется наличие международного свидетельства о вакцинации против ЖЛ для путешественников.

В настоящее время проблема распространения ВЖЛ является актуальной и для Российской Федерации. Так, в районе г. Сочи (Краснодарский край) были обнаружены местные популяции комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* [6, 7]. После долгого отсутствия комары *Ae. aegypti* вновь зарегистрированы на территории Черноморского побережья Кавказа и в Крыму. В случае заноса возбудителя не исключена возможность возникновения вспышки ЖЛ и на этих территориях [8, 9]. Также всё большую популярность среди населения приобретают туристические направления в экзотические страны и регионы, где при въезде необхо-

дим международный сертификат о вакцинации против ЖЛ. По данным Роспотребнадзора Российской Федерации, в 2021 г. живой аттенуированной вакциной против ЖЛ производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова (Москва) было вакцинировано более 11 тыс. россиян [10]. Но в то же время наборы реагентов для выявления специфических антител (IgM и IgG) к ВЖЛ и оценки эффективности иммунизации ни одной отечественной компанией не производятся.

По данным литературы, в настоящее время в мире зарегистрировано не более 10 диагностических препаратов, позволяющих выявлять специфические антитела классов IgM или IgG к ВЖЛ, но все они рекомендованы исключительно для научных исследований. Также есть ограничения по использованию данных тестов для выявления антител у вакцинированных людей [11]. На территории Российской Федерации разрешены к применению 6 коммерческих наборов для выявления антител IgM/IgG к возбудителю ЖЛ производства компании Euroimmun (Германия), которые основаны на использовании метода непрямой иммунофлуоресценции специфических антител. Ограничениями для широкого использования этих тестов являются сложность интерпретации результатов, небольшое количество одновременно анализируемых проб (до 10) и высокая стоимость, по сравнению с другими препаратами для диагностики ВЖЛ.

Одним из широко используемых методов для выявления как вирусных антигенов, так и специфических антител к возбудителю, является иммуноферментный анализ (ИФА), который обладает рядом преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями:

- высокая чувствительность;
- специфичность и воспроизводимость результатов;
- возможность получения количественных данных;
- автоматизация всех этапов постановки.

В связи с этим вопрос разработки и внедрения в практику препаратов для оценки качества иммунизации и диагностики ЖЛ, основанных на исполь-

зовании метода ИФА, является очень актуальным. Для создания таких диагностических наборов необходимо использовать антигенные белки, способные высокоспецифично связываться с иммуноглобулинами классов IgM и IgG в организме инфицированного, переболевшего или вакцинированного человека. В составе вирусного генома ВЖЛ имеются 3 гена, кодирующие белки E, NS1 и NS3, которые способны индуцировать иммунный ответ в организме (рис. 1). Белок E отвечает за начальные фазы инфицирования клеток-хозяев, а также является основной мишенью для иммунного ответа хозяина. Белки NS1 и NS3 связаны с инфицированной клеткой и также являются мишенями для иммунной элиминации. Антитела к белку NS1 связывают компоненты системы комплемента и способствуют формированию защитного иммунитета, лизируя инфицированные клетки [5].

Белок E флавивирусов состоит из трёх отдельных доменов, которые соединены короткими гибкими шарнирными областями. Первый является центральным и соединяет два других; второй представляет собой удлинённую структуру, которая обеспечивает димеризацию белков E в зрелом вирионе [12]; а третий принимает иммуноглобулин-подобную складку на С-конце и также представляет собой ту часть белка E, которая выступает дальше всего от поверхности зрелого вириона и, предположительно, содержит сайты связывания для клеточных факторов, участвующих в прикреплении и проникновении вируса в клетку [13].

Согласно литературным данным, все три домена белка E распознаются нейтрализующими антителами, хотя и с сильно варьирующей активностью [1]. Показано, что третий домен белка E ВЖЛ имеет особенно-

сти аминокислотного состава, которые отличают его от аналогичных белковых структур других флавивирусов [14]. Эти различия являются уникальными для ВЖЛ и представляют собой типоспецифичные эпитопы нейтрализации для отдельных флавивирусов, и поэтому данный участок белка можно использовать для специфической серодиагностики ВЖЛ.

Целью нашего исследования была разработка способа выявления специфических антител класса IgG к белку E ВЖЛ методом ИФА. В работе описаны этапы получения и очистки рекомбинантного аналога третьего домена белка E ВЖЛ, оптимизации его сорбирования на полистироловых планшетах и тестирование полученного набора реагентов.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали вакцинный штамм 17D ВЖЛ, который нарабатывали на клеточной культуре *Aedes albopictus* C6/36, полученной из коллекции культур клеток ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора [15].

Получение кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота) ВЖЛ. Выделение суммарных нуклеиновых кислот и постановка реакции обратной транскрипции производились с использованием коммерческих наборов «РИБО-преп» и «Реверта-100-L» (ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора), согласно инструкциям производителя.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенирование. Дизайн олигонуклеотидных праймеров осуществляли при помощи программы PerlPrimer v. 1.1.21 [16], используя известные нуклеотидные

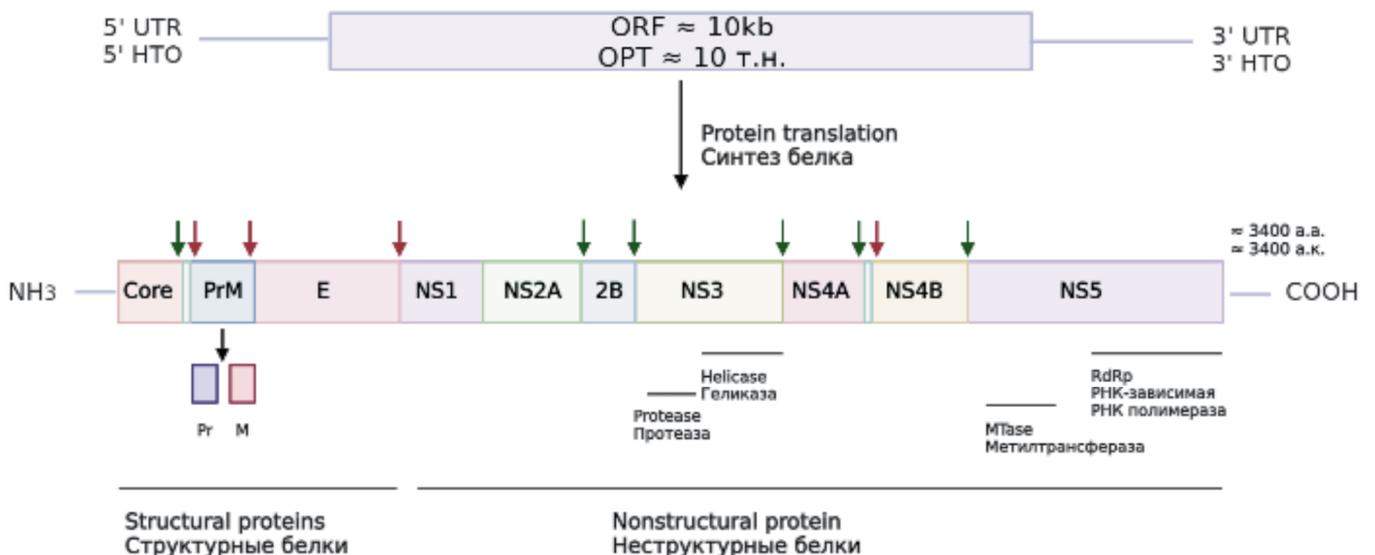


Рис. 1. Схематичное изображение вирусной РНК и полипротеинов вируса жёлтой лихорадки. Стрелки указывают сайты расщепления в полипротеине, которые процессируются протеазами клеточного (красные стрелки) или вирусного происхождения (зелёные стрелки).

Fig. 1. Schematic representation of YFV viral RNA and polyprotein. Arrows indicate cleavage sites in the polyprotein that are processed by cellular (red arrows) or viral (green arrows) proteases.

последовательности геномов ВЖЛ, доступные в базе данных GenBank [17]. Анализ вставок проводили с праймерами, комплементарными плазмидной ДНК с обоих концов от вставки (табл. 1). Продукты амплификации секвенировали по обеим цепям модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза на автоматическом секвенаторе 3130xl GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием пакета программ UniproUGENE v.1.30 [18] и MEGA7 [19].

Получение гибридной плазмиды и клонов-продуцентов. Для клонирования использовали 2 мкл свеженаработанного ампликона и 0,5 мкл вектора pET160-TOPO по инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Выделение плазмидной ДНК осуществляли, используя «Набор diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий» («ДИАЭМ», Россия). Гибридной плазмидой трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, США) и засеивали на чашки Петри с агаризованной средой LB (AppliChem, Германия) с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл в качестве селективного маркера. Полученные клоны-продуценты анализировали по уровню экспрессии после индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) с SDS по Лэммли [20].

Выделение рекомбинантного белка. Очистку белка осуществляли из клеточного осадка, полученного из 500 мл бактериальной культуры, индуцированной

ной ИПТГ, коммерческим набором His-Spin Protein Miniprep (Zymo Research, США).

Подбор оптимальных условий сорбирования антигена. Полученный очищенный рекомбинантный белок сорбировали на полистироловых планшетах для ИФА (Thermo Fisher Scientific, США) в трёх сорбционных растворах: ацетатном (pH 4,5), карбонатном (pH 11,5) и карбонатно-бикарбонатном (pH 9,6). Блокировку осуществляли двумя разными растворами: сахарозой или пептоном с казеином. Подробный состав буферов представлен в табл. 2.

Обработка схемы ИФА. Твердофазный ИФА проводили в два этапа. Исследуемые образцы инкубировали с антигеном, сорбированным на полистироловые планшеты (в разведении 1 : 500) и после пятикратной отмывки от несвязавшегося с антигеном материала инкубировали с конъюгатом против IgG человека. Затем после второй пятикратной отмывки от образовавшихся иммунных комплексов производили визуализацию результатов ИФА путём добавления раствора хромогена. После внесения стоп-реагента учитывали результаты реакции на планшетном ридере MultiscanGO (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм с референс-волной при 630 нм.

Постановка вестерн-блоттинга. Предварительно выполняли электрофоретическое разделение белка в денатурирующих условиях в 12% ПААГ. Далее переносили белки из геля на нитроцеллюлозную мембрану с использованием спиртового Tris-HCl-буфера (pH 8,0) и камеру для полусухого переноса. Результат детектировали окраской мембраны пунцовым S. Блоттинг осуществляли в вакуум-системе

Таблица 1. Перечень олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Table 1. List of oligonucleotide primers used in the study

Праймер Primer	Структура Structure	Длина фрагмента (bp) Fragment length(bp)	Температура отжига (°C) Annealing temperature (°C)
E3F	5'CACCGCCGCCACTATCAGAGTACTGG 3'	480	57
E3R	5'CTTTCCTATTGARCTTCCCTCTTTGTGC 3'		
pET-F	5'GACTCACTATAGGGGAATTGTGAGC 3'	338	54
pET-R	5'STAGTTATTGCTCAGCGGTGGC 3'		

Таблица 2. Сорбционные и блокирующие растворы

Table 2. Sorption and blocking solutions

Наименование буфера Buffer name	Состав Composition	pH
Ацетатный Acetate	1M CH ₃ COOH	4,5
Карбонатный Carbonate	Na ₂ CO ₃ , NaN ₃	11,5
Карбонатно-бикарбонатный Carbonate-bicarbonate	Na ₂ CO ₃ , Na ₂ HCO ₃	9,6
Раствор для блокировки 1 Blocking solution 1	0,1% казеин (casein), 1% сахароза (sucrose)	–
Раствор для блокировки 2 Blocking solution 2	0,1% казеин (casein), 1% пептон (peptone)	–

SNAPID (Millipore, США). Блокировку мембраны проводили 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,1% твина 20 (ФСБ-Т). После выполняли последовательные инкубации с сыворотками и конъюгатом антител против иммуноглобулинов человека с щелочной фосфатазой (Sigma, США), затем мембрану отмывали раствором ФСБ-Т. Хромогенную реакцию выполняли готовым субстратом BCIP/NBT (Sigma, США). Реакцию останавливали отмывкой дистиллированной водой. Полученные после анализа мембраны высушивали и учитывали результаты блота в гель-документирующей системе iBright CL750 (Thermo Fisher Scientific, США). Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения Invitrogeni Bright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, США).

Используемые сыворотки. Перечень сывороток крови людей, используемых в настоящем исследовании, указан в **табл. 3**. Присутствие или отсутствие антител в сыворотках было подтверждено следующими коммерческими диагностическими препаратами: набор реагентов для выявления антител класса IgG к ВЖЛ методом ИФА Human Yellow Fever Virus IgG (YFV-IgG) (Abbexa, Великобритания); набор реагентов для выявления антигена NS1 вирусов денге и специфических антител IgM/IgG методом иммунохроматографического анализа (ИХА) Dengue fever rapid diagnostic test (Dengue Duo) (SD BIOLINE, Южная Корея); набор реагентов для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита «ВектоВКЭ-IgG» (№ РЗН 2017/5605) и набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуногло-

булинов классов G и M к вирусу гепатита С «Бест анти-ВГС» (№ РЗН 2015/2352) («ВекторБЕСТ», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования сывороток крови жителей Гвинейской Республики одобрен решением Этического комитета Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

Результаты и обсуждение

В результате генно-инженерных манипуляций была получена гибридная плазмида pET160-E3, содержащая открытую рамку считывания, кодирующую фрагмент гена белка E длиной 221 а.о. с шестью остатками гистидина, что обеспечивает последующее выделение белка на Ni-хелатном носителе и остатками полилинкера векторной плазмиды pET160 под контролем промотора фага T7.

Клонированный фрагмент гена белка E ВЖЛ использовали в качестве ДНК-матрицы для получения рекомбинантного аналога третьего домена в клетках *E. coli* (штамм BL-21 (DE3)). Штамм, трансформированный плазмидной ДНК pET160-E3, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл), после чего добавляли индуктор Lac-оперона ИПТГ в различных концентрациях (0,1, 1 и 10 мМ) и культивировали при разных температурах (25, 30 и 37°C при покачивании на 180 об/мин) с отбором проб в трёх временных точках: до индукции, через 5 и 18 ч после добавления ИПТГ. Выбор клонов-продуцентов про-

Таблица 3. Образцы использованных в исследовании сывороток крови людей

Table 3. Human serum samples used in the study

Исследуемый материал Tested samples	Количество образцов Number of samples
Сыворотки крови людей, вакцинированных против ВЖЛ (Российская Федерация) Sera of people vaccinated against YFV (Russian Federation)	30
Сыворотки крови больных и переболевших ЛД (Российская Федерация) Sera of patients and recovered from DENV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови людей, вакцинированных против ВКЭ (Российская Федерация) Sera of people vaccinated against TBEV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови больных ВГС (Российская Федерация) Sera of patients with HCV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови людей, у которых отсутствуют антитела к ВЖЛ, ЛД, ВКЭ и ВГС (Российская Федерация) Sera of people who do not have antibodies to YFV, DENV, TBEV and HCV (Russian Federation)	30
Сыворотки крови людей с неизвестным иммунным статусом по ВЖЛ (Гвинейская Республика) Sera of people with unknown immune status for YFV (Republic of Guinea)	250

Примечание. ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки; ЛД – лихорадка денге; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВГС – вирус гепатита С.

Note. YFV – yellow fever virus; DENV – dengue virus; TBEV – tick-borne encephalitis virus, HCV – hepatitis C virus.

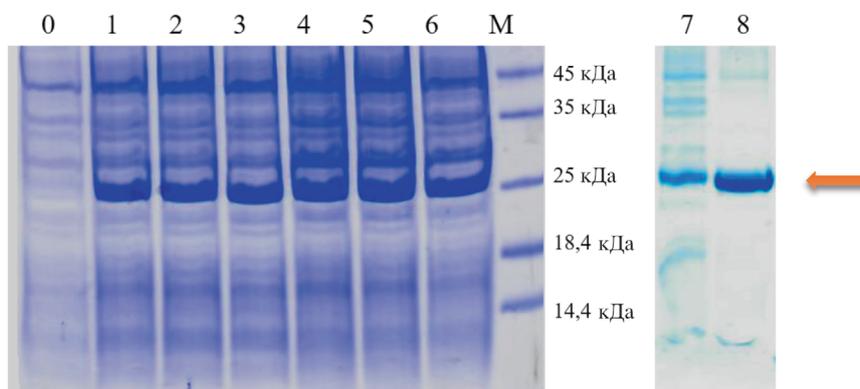


Рис. 2. Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* BL-21 (DE3) и очищенного рекомбинантного белка в 15% ПААГ-электрофорезе с SDS: 0 – до индукции ИПТГ; 1–7 – инкубация при 25°C при различных условиях: 1–3 инкубация в течение 5 ч после добавления ИПТГ в концентрациях 0,1, 1 и 10 мМ соответственно; 4–6 – инкубация в течение 18 ч после добавления ИПТГ в концентрациях 0,1, 1 и 10 мМ соответственно; 7 – спустя 18 ч после добавления ИПТГ 1 мМ/мл; 8 – очищенный рекомбинантный белок. Стрелкой обозначено положение рекомбинантного белка Е ВЖЛ. М – маркер; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки.

Fig. 2. Electrophoregram of *E. coli* BL-21 (DE3) cell lysates and purified recombinant protein in 15% PAGE-electrophoresis with SDS: 0 – before IPTG induction; 1–7 – incubation at 25°C under various conditions: 1–3 incubation for 5 hours after adding IPTG at concentrations of 0.1, 1 and 10 mM, respectively; 4–6 – incubation for 18 hours after adding IPTG at concentrations of 0.1, 1 and 10 mM, respectively; 7 – 18 hours after adding IPTG at concentration 1 mM/ml; 8 – purified recombinant protein. The arrow indicates the position of the recombinant YFV E protein. M – marker. (IPTG – isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; YFV – yellow fever virus).

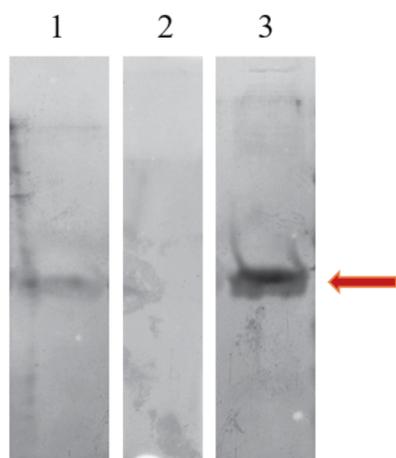


Рис. 3. Результаты выявления очищенного антигена методом вестерн-блоттинга: дорожка 1 – обработанная сывороткой, содержащей антитела к вирусу денге; дорожка 2 – обработанная сывороткой, не содержащей антитела к ВЖЛ, ВКЭ, ВГС, вирусу денге; дорожка 3 – обработанная сывороткой крови с антителами к ВЖЛ. Стрелкой обозначено положение рекомбинантного белка Е ВЖЛ. ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВГС – вирус гепатита С.

Fig. 3. The results of the detection of the purified antigen by Western blotting: lane 1 – treated with serum containing antibodies to the dengue virus; lane 2 – serum that does not contain antibodies to YFV, TBEV, HCV, dengue virus; lane 3 – blood serum with antibodies to YFV. The arrow indicates the position of the recombinant YFV E protein. YFV – yellow fever virus; TBEV – tick-borne encephalitis virus; HCV – hepatitis C virus.

водили по наличию экспрессируемого белка методом электрофореза в 15% ПААГ (рис. 2) с SDS. В серии экспериментов показано, что максимальная продукция рекомбинантного белка происходит на 18-й час

инкубации при температуре 25°C после добавления индуктора в конечной концентрации 1 мМ/мл.

После подбора оптимальных условий получения рекомбинантного белка Е ВЖЛ в составе лизатов клеток *E. coli* была произведена его наработка в 500 мл культуральной среды LB (при температуре 25°C 180 об/мин в течение 18 ч после добавления ИПТГ (в конечной концентрации 1 мМ/мл)) и дальнейшая очистка на Ni-хелатном носителе. Гомогенность и степень очистки белка определяли также с помощью электрофореза в 15% ПААГ с SDS. Полученный рекомбинантный белок представлен единичной полосой с молекулярной массой ≈23,5 кДа (рис. 2).

Для определения специфичности взаимодействия полученного рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ, а также её отсутствия к антителам других флавивирусов нами был проведён ряд экспериментов с использованием вестерн-блот-анализа и ИФА.

Исследование в вестерн-блот-анализе показало специфичное взаимодействие образца сыворотки крови, содержащей антитела к ВЖЛ, с иммобилизованным на нитроцеллюлозной мембране рекомбинантным вирусным антигеном. Окрашивание происходило в зоне соответствия молекулярной массы и не наблюдалось в двух контрольных полосках на нитроцеллюлозных мембранах, обработанных сыворотками крови, в которых отсутствовали антитела к ВЖЛ (рис. 3).

Следующим этапом работы были подбор оптимальных условий для сорбции очищенного рекомбинантного белка Е ВЖЛ на полистироловых планшетах и выбор подходящего блокирующего буфера. Для сорбирования полученный препарат разводили 1 : 500 в трёх сорбционных растворах – ацетатном, карбонатном и карбонатно-бикарбонатном. В каче-

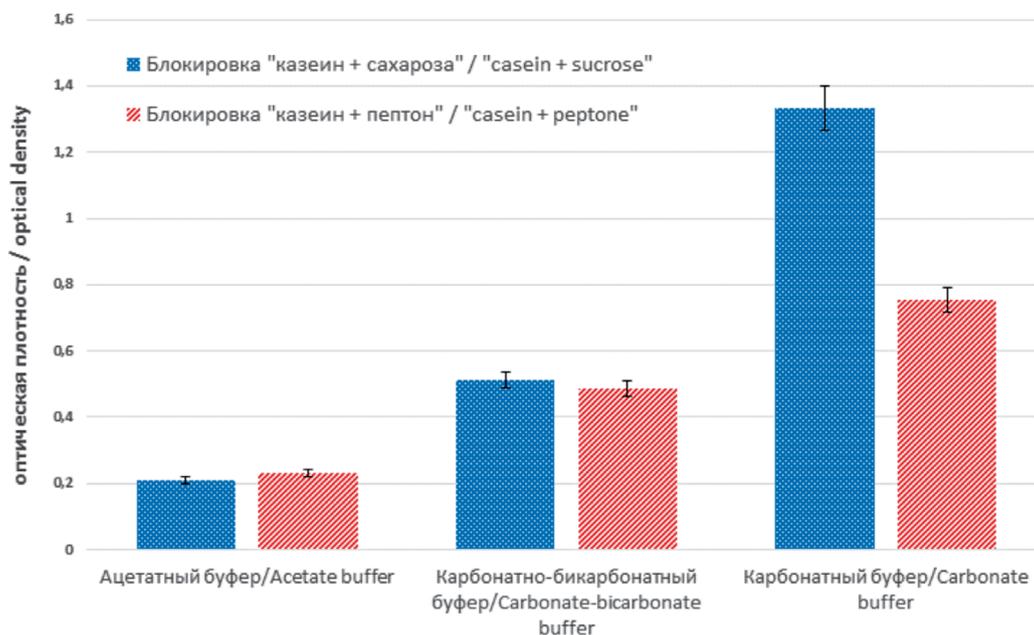


Рис. 4. Результаты иммуноферментного анализа для определения оптимальных условий для сорбции рекомбинантного антигена вируса жёлтой лихорадки (разведение сыворотки крови 1 : 100).

Fig. 4. The results of ELISA performed to determine the optimal conditions for the sorption of the recombinant YFV antigen (dilution of blood serum 1 : 100).

стве блокирующих буферов использовали два варианта растворов казеина – с сахарозой или пептоном. Далее был проведён ИФА с использованием сыворотки крови (в разведении 1 : 100), имеющей антитела к ВЖЛ.

Как показано на графике (рис. 4), при использовании ацетатного сорбционного буфера оптическая плотность при образовании иммунных комплексов рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ составляла 0,209 о.е. при использовании блокирующего раствора «казеин + сахароза», а с блокирующим раствором «казеин + пептон» – 0,230 о.е. При сорбировании рекомбинантного антигена с использованием карбонатного буфера и блокировки раствором «казеин + сахароза» чувствительность достигала 1,333 о.е., а при блокировании раствором «казеин + пептон» – 0,753 о.е. Аналогичные показатели для карбонатно-бикарбонатного буфера составляли 0,512 и 0,487 о.е. для блокирующих растворов «казеин + сахароза» и «казеин + пептон» соответственно. Таким образом, было показано, что оптимальными условиями для обеспечения высокого уровня специфичности рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ является использование карбонатного сорбционного буфера и блокирующего раствора, в состав которого входят казеин и сахароза.

Оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного аналога третьего домена белка Е ВЖЛ проведена с использованием сформированной панели образцов сывороток крови людей (табл. 3).

Диагностическую чувствительность определяли с использованием панели сывороток крови людей, вакцинированных против ВЖЛ, при проведении ИФА

с применением анти-IgG-конъюгата. Положительный результат выявлен в 100% случаев. Таким образом, диагностическая чувствительность сконструированного нами экспериментального набора реагентов для выявления IgG к ВЖЛ составила не менее 98% с доверительной вероятностью 90%.

Для определения специфичности разработанной методики тестировали сыворотки крови людей, которые не были вакцинированы против ЖЛ. При исследовании всех образцов был получен отрицательный результат. Диагностическая специфичность составила не менее 99%.

В твердофазном ИФА все пробы от вакцинированных против ВЖЛ были положительными, и величина оптической плотности (ОП) колебалась от 0,599 до 2,820 (при ОП_{крит.} = 0,260). Положительных образцов среди групп сравнения не выявлено.

Проведено сравнение эффективности коммерческого набора реагентов Human Yellow FeverVirusIgG (YFV-IgG) (Abbexa, Великобритания) и экспериментальной ИФА тест-системы. Для этого использовали 30 сывороток крови, полученных от вакцинированных против ВЖЛ в разные годы, 1 – от пациента с диагнозом «лихорадка денге», 1 – от пациента с диагнозом «гепатит С» и 1 – от пациента с отсутствием антител к вышеперечисленным вирусам. Сыворотки тестировали в разведении 1 : 100. При анализе сывороток, содержащих антитела к ВЖЛ, как с использованием коммерческого набора, так и разработанного нами лабораторного варианта ИФА тест-системы иммуноглобулины класса IgG к ВЖЛ были обнаружены во всех исследуемых пробах. Сыворотки сравнения

показали отрицательный результат при их исследовании двумя тест-системами.

Апробация экспериментальной тест-системы была проведена на 250 образцах сывороток крови жителей Гвинейской Республики, которая является эндемичной по ЖЛ и в которой ежегодно регистрируются случаи заболеваний. В связи с тем, что на данной территории широко распространены и возбудители малярии, полученный материал перед основными исследованиями был протестирован методом ИХА для выявления антигенов малярийных плазмодиев с наборами реагентов SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan (Standart Diagnostics, Inc., Республика Южная Корея). Образцы, в которых присутствовали антигены возбудителей малярии, в последующую работу не были включены для исключения получения неспецифических результатов. При проведении исследований было выявлено 34,8% положительных проб, содержащих антитела класса IgG к ВЖЛ.

Заключение

В результате проведённых исследований была сконструирована плаزمид, содержащая фрагмент гена иммуногенного белка Е ВЖЛ в бактериальной системе *E. coli*, на основании которой создан штамм-продуцент белка, содержащего антигенные детерминанты ВЖЛ, и получен рекомбинантный антиген. Специфичность и чувствительность полученных препаратов подтверждена иммунологическими методами, в результате показано, что искусственно созданный аналог белка Е обладает антигенными свойствами и даёт возможность определять специфические антитела к ВЖЛ в сыворотках вакцинированных людей. Показано, что полученный рекомбинантный антиген не имеет перекрёстных реакций с другими флавивирусами (вирусами денге, клещевого энцефалита и гепатита С).

Таким образом, был разработан способ выявления специфических антител класса IgG к белку Е ВЖЛ методом ИФА, проведена оптимизация условий анализа, сконструированы экспериментальные серии препарата. Данный диагностический набор может быть использован для изучения протективных свойств вакцины от ЖЛ, а также для идентификации случаев инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Health topic. Yellow fever. Available at: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever>
2. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология: руководство*. М.: МИА; 2008.
3. Lindenbach B.D., Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 23–61. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59002-9)
4. Douam F., Ploss A. Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* 2018; 26(11): 913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>
5. Monath T.P. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2001; 1(1): 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
6. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L. и *Aedes albopictus* skuse – новая биологическая угроза для юга России. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2012; (3): 49–55.
7. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжоннова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* на тер-

- ритории Российской Федерации. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2012; (1): 3–4.
8. Коваленко И.С., Якунин С.Н., Абибулаев Д.Э., Владычак В.В., Бородай Н.В., Смелянский В.П. и др. Обнаружение *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) в Крыму. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 135–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-135-137>
9. Ясюкевич В.В., Попов И.О., Титкина С.Н., Ясюкевич Н.В. Адвентивные виды *Aedes* на территории России – оценка риска новой биологической угрозы здоровью населения России. *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. 2017; 28(3): 51–71. <https://doi.org/10.21513/0207-2564-2017-3-51-71>
10. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Удмуртской Республике. О профилактике желтой лихорадки; 2022. Available at: <https://18.rospotrebnadzor.ru/content/354/110271/>
11. Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В. Современные лабораторные методы выявления возбудителя желтой лихорадки. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (2): 24–32. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-202-2-21-32>
12. Heinz F.X., Stiasny K., Püschner-Auer G., Holzmann H., Allison S.L., Mandl C.W., et al. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. 1994; 198(1): 109–17. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>
13. Chávez J.H., Silva J.R., Amarilla A.A., Moraes Figueiredo L.T. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*. 2010; 38(6): 613–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.07.004>
14. Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009; 394(1): 12–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.001>
15. Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г. Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Новосибирск: ЦЭРИС; 2009.
16. Marshall O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004; 20(15): 2471–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
17. National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
18. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. UniPro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8): 1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

REFERENCES

1. WHO. Health topic. Yellow fever. Available at: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever>
2. L'vov D.K., ed. *Medical Virology: Manual [Meditsinskaya virusologiya: rukovodstvo]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
3. Lindenbach B.D., Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 23–61. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59002-9)
4. Douam F., Ploss A. Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* 2018; 26(11): 913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>
5. Monath T.P. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2001; 1(1): 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
6. Ganushkina L.A., Dremova V.P. Mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* skuse – a new biological threat to the south of Russia. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2012; (3): 49–55. (in Russian)
7. Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. On the detection of *Aedes (Stegomyia) albopictus* mosquitoes on

- the territory of the Russian Federation. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2012; (1): 3–4. (in Russian)
8. Kovalenko I.S., Yakunin S.N., Abibulaev D.E., Vladychak V.V., Boroday N.V., Smelyanskiy V.P., et al. Obnaruzhenie Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1895) v Krymu. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (2): 135–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-135-137> (in Russian)
 9. Yasyukevich V.V., Popov I.O., Titkina S.N., Yasyukevich N.V. Adventive species of Aedes in Russia – the risk assessment of a new biological threat to the health of the population of Russia. *Problemy ekologicheskogo monitoringa i modelirovaniya ekosistem*. 2017; 28(3): 51–71. <https://doi.org/10.21513/0207-2564-2017-3-51-71> (in Russian)
 10. Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Udmurt Republic. On the prevention of yellow fever; 2022. Available at: <https://18.rosпотреbnadzor.ru/content/354/110271/> (in Russian)
 11. Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naydenova E.V. Advanced laboratory methods for detecting yellow fever pathogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (2): 24–32. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-202-2-21-32> (in Russian)
 12. Heinz F.X., Stiasny K., Püschner-Auer G., Holzmann H., Allison S.L., Mandl C.W., et al. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. 1994; 198(1): 109–17. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>
 13. Chávez J.H., Silva J.R., Amarilla A.A., Moraes Figueiredo L.T. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*. 2010; 38(6): 613–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.07.004>
 14. Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009; 394(1): 12–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.001>
 15. Radaeva I.F., Nechaeva E.A., Drozdov I.G. *Collection of Cell Cultures of the Federal State Budgetary Institution of the World Bank «Vector» of Rospotrebnadzor [Kollektsiya kul'tur kletok FBUN GNTs VB «Vektor» Rospotrebnadzora]*. Novosibirsk: TsERIS; 2009. (in Russian)
 16. Marshall O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004; 20(15): 2471–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
 17. National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
 18. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Uni-pro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8): 1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
 19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>