

Личная Е.В.<sup>1</sup>, Климашевская С.В.<sup>2</sup>, Обрядина А.П.<sup>2</sup>, Вербов В.Н.<sup>1</sup>, Белопольская М.А.<sup>3,4</sup>, Эсауленко Е.В.<sup>1</sup>, Калинина О.В.<sup>1,5</sup>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ F ВИРУСА ГЕПАТИТА С МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

<sup>1</sup>ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», 197101, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ООО «НПО «Диагностические системы», 603093, Нижний Новгород, Россия;

<sup>3</sup>СПбГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», 195067, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>5</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», 197341, Санкт-Петербург, Россия

---

*В области core гена вируса гепатита С (ВГС) располагается альтернативная рамка считывания, кодирующая один белок, известный как белок F, или core+1/ARFP. Наличие антител к белку F ВГС в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С свидетельствует об экспрессии белка in vivo. В данной работе отработана методика иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием синтетического пептида F10, соответствующего антигенной детерминанте белка F ВГС субтипа 1b, для определения антител к белку F в образцах сыворотки крови. Иммуногенность и иммунохимическая специфичность синтетического пептида F10 доказана на лабораторных животных (мышах).*

**Ключевые слова:** вирус гепатита С; хронический гепатит С; белок F; иммуноферментный анализ.

**Для цитирования:** Личная Е.В., Климашевская С.В., Обрядина А.П., Вербов В.Н., Белопольская М.А., Эсауленко Е.В., Калинина О.В. Определение антител к белку F вируса гепатита С методом иммуноферментного анализа с использованием синтетического пептида. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(3): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-183-186>

---

**Для корреспонденции:** Личная Евгения Викторовна, мл. науч. сотр. лаборатории вирусных гепатитов; e-mail: [evlichnaya@gmail.com](mailto:evlichnaya@gmail.com)

Lichnaia E.V.<sup>1</sup>, Klimashevskaya S.V.<sup>2</sup>, Obryadina A.P.<sup>2</sup>, Verbov V.N.<sup>1</sup>, Belopolskaya M.A.<sup>3,4</sup>, Esaulenko E.V.<sup>1</sup>, Kalinina O.V.<sup>1,5</sup>

THE DETECTION OF ANTIBODIES TO HCV F PROTEIN WITH IMMUNE ENZYME ANALYSIS USING SYNTHETIC PEPTIDE

<sup>1</sup>The Federal Budget Institution of Science "The Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology", 197101, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>The R&D Production Complex "Diagnostic Systems", 603093, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>3</sup>The St. Petersburg State Budget Institution of Health Care "The S.P. Botkin Clinical Infection Hospital", 195067, St. Petersburg, Russia

<sup>4</sup>The Federal State Budget Scientific Institution "The Institute of Experimental Medicine", 197376, St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup>The Federal State Budget Institution "The V.A. Almazov National Medical Research Center", 197341, St. Petersburg, Russia

*Alternative reading frame encoding a single protein known as protein F or core + 1 / ARFP is located in the core region of the hepatitis C virus (HCV) genome. The presence of antibodies to the F protein of HCV in the serum of patients with chronic hepatitis C indicates the expression of this protein in vivo. In this study, to determine antibodies to the F protein of HCV in serum samples the methodology of the enzyme immunoassay (ELISA) was developed using the synthetic peptide F10 corresponding to the antigenic determinant of the F protein of the HCV subtype 1b. The immunogenicity and immunochemical specificity of synthetic F10 peptide has been demonstrated in laboratory animals (mice).*

**Key words:** hepatitis C virus; chronic hepatitis C; protein F; enzyme-linked immunosorbent assay.

**For citation:** Lichnaia E.V., Klimashevskaya S.V., Obryadina A.P., Verbov V.N., Belopolskaya M.A., Esaulenko E.V., Kalinina O.V. The detection of antibodies to HCV F protein with immune enzyme analysis using synthetic peptide. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(3): 183-186. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-183-186>

**For correspondence:** Lichnaia E.V., junior research associate, laboratory of viral hepatitis e-mail: [evlichnaya@gmail.com](mailto:evlichnaya@gmail.com)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study was partially supported by the young scientists grant of the Federal Budget Institution of Science "The Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology".

Received 01.11.2017  
Accepted 08.11.2017

**Введение.** Вирусный гепатит С является одной из ведущих причин хронических заболеваний печени с высоким риском развития цирроза печени и гепатокарциномы [1]. В изучении гепатита С актуальным остаётся поиск факторов, влияющих на прогрессирование инфекционного процесса.

Высокая генетическая вариабельность вируса гепатита С (ВГС) определяет появление постоянно меняющихся антигенных структур вируса. Геном вируса представлен (+)-цепью РНК длиной около 9600 нуклеотидов. Открытая рамка считывания (ORF), ограниченная 5'-UTR и 3'-UTR (untranslated region – нетранслируемыми участками), кодирует полипротеин, состоящий из ~ 3000 аминокислотных остатков (а.о.). Во время вирусной репликации полипротеин расщепляется вирусными и клеточными протеазами на 10 белков: три структурных (core, E1, E2) и семь неструктурных (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). В области core гена располагается дополнительная альтернативная рамка считывания, которая кодирует один белок, получивший название F (frameshift) или core+1/ARFP (alternative reading frame protein) [2, 3]. Состав и длина белка F варьируют в зависимости от генотипа вируса, его роль в морфогенезе вируса и патогенезе инфекционного процесса остаётся неясной [4, 5, 6]. Обнаружение антител к этому белку в сыворотке крови пациентов, инфицированных ВГС, указывает на его экспрессию в процессе естественного течения гепатита С. В ряде исследований установлено, что антитела к данному белку имеют около 25% пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) и 50% больных ХГС с первичным раком печени [7, 8].

Целью данного исследования была отработка методики выявления антител к белку F ВГС в образцах сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием синтетического пептида.

**Материал и методы.** В работе исследованы 165 образцов сыворотки крови, полученных от доноров станций переливания крови. В рамках регламентированного скрининга донорской крови все образцы проанализированы на наличие серологических маркеров к ВГС, вирусу гепатита В (ВГВ) и вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ). Из данных образцов

сформированы 5 панелей: панель № 1 включала анти-ВГС-позитивные образцы сыворотки крови ( $n = 72$ ); панель № 2 – анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-позитивные образцы сыворотки крови ( $n = 35$ ); панель № 3 – анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-негативные образцы сыворотки крови ( $n = 7$ ); панель № 4 – HBsAg-позитивные/анти-ВГС-негативные образцы сыворотки крови ( $n = 31$ ); панель № 5 – анти-ВГС-негативные/анти-ВИЧ-негативные/HBsAg-негативные образцы сыворотки крови ( $n = 20$ ).

Синтетический пептид F10 получен путём твёрдофазного синтеза (ООО «НПФ Верта», г. Санкт-Петербург). Последовательность аминокислот синтетического пептида (110–131 а.о.) соответствовала антигенной детерминанте белка F/core+1/ARFP изолятов ВГС субтипа 1b.

Иммуногенные свойства синтетического пептида F10 изучены на лабораторных животных (мышь). Для получения гипериммунных сывороток иммунизировали самок мышей линии BALB/c в возрасте 12 нед (массой 35 г). Синтетический пептид F10 растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия в концентрации 1 мг/мл, смешивали с равным объёмом пол-

Таблица 1

Результаты выявления антител к белку F ВГС в образцах сыворотки крови

Панель	Количество образцов	Анти-F-позитивные образцы, $n$ (%)
№ 1 – анти-ВГС(+)	72	7 (9,7)
№ 2 – анти-ВИЧ(+)/анти-ВГС(+)	35	7 (20,0)
№ 3 – анти-ВИЧ(+)/анти-ВГС(-)	7	0
№ 4 – HBsAg(+)/анти-ВГС(-)	31	0
№ 5 – анти-ВГС(-)/анти-ВИЧ(-)/HBsAg(-)	20	0
Всего...	165	14 (8,5)

Таблица 2

Антитела к белку F ВГС в образцах сыворотки крови панелей № 1 и № 2

Показатель	Анти-ВГС(+)	Анти-ВИЧ(+)/ анти-ВГС(+)	Всего
Анти-F(+)	7	7	14
Анти-F(-)	65	28	93
Всего...	72	35	107

ного адьюванта Фрейнда (ПАФ) и вводили подкожно по 200 мкл. Мышей иммунизировали 4-кратно с интервалом 2 нед. Кровь забирали тотально через 12 дн после последнего введения антигена. Полученные сыворотки аликвотировали и хранили при температуре -20°C.

Синтетический пептид F10 сорбировали в лунках 96-луночных планшетов фирмы «NUNC» (Дания) в 0,02 М бикарбонатно-карбонатном буферном растворе с pH 9,6 в течение 24 ч при комнатной температуре. Для блокировки свободных центров связывания на планшетах использовали фосфатно-солевой раствор с pH 7,2 с добавлением 0,1% Tween-20 (ФСР-Т) и 1% бычьего сывороточного альбумина. Исследуемые образцы сыворотки крови вносили в лунки по 100 мкл в разведении 1:10 в буферном растворе. При анализе образцов сыворотки крови человека использовали пероксидазный конъюгат на основе моноклональных антител к тяжелой цепи IgG человека; при анализе мышшиной сыворотки крови - пероксидазный конъюгат на основе козжих поликлональных антител к IgG мыши, разведённый в растворе ФСР-Т, содержащем 1% сыворотки крупного рогатого скота. Субстратом служил раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с перекисью водорода (ТМБ). Инкубацию осуществляли в течение 45 мин при температуре 37°C. После каждой инкубации планшет промывали раствором ФСР-Т 5 раз. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм, референс-фильтр 630 нм. Результаты анализа оценивали по величине коэффициента позитивности (КП) - отношению оптической плотности (ОП) исследуемого образца к критической оптической плотности (ОП<sub>крит</sub>), где ОП<sub>крит</sub> = 0,2 + ОП<sub>ср</sub> К(-) (ОП<sub>ср</sub> К(-) - среднее значение ОП для отрицательного контроля). Положительными считали образцы, величина КП которых больше 2,0.

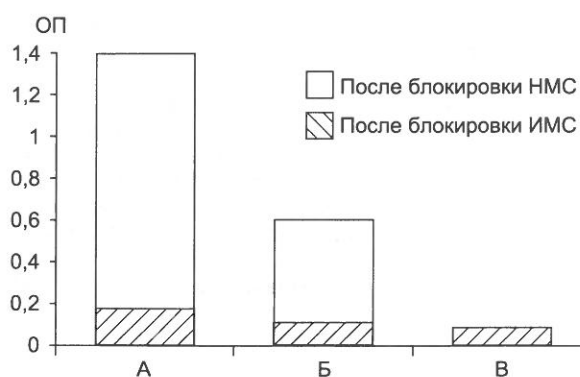


Рис.2. Значения ОП после блокировки синтетического пептида ИМС и НМС при анализе пулированных анти-ВГС-позитивных образцов сыворотки крови из панели 1 (А), анти-ВИЧ-позитивных/анти-ВГС-позитивных образцов сыворотки крови панели 2 (Б) и пулированных анти-ВГС-негативных/анти-ВИЧ-негативных/НВsAg-негативных образцов сыворотки крови из панели 5 (В).

Для оценки статистической значимости отличий между панелями № 1 (анти-ВГС- позитивные образцы сыворотки крови) и № 2 (анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-позитивные сыворотки крови) для качественных признаков применяли критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Статистически значимыми считались отличия при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Антитела к синтетическому пептиду F10 в образцах сыворотки крови мышей определяли методом ИФА после последней иммунизации. В сыворотке крови интактных мышей специфические антитела к синтетическому пептиду не выявлялись. В образцах сыворотки крови иммунизированных мышей титр антител к пептиду F10 составил 1:1600 (рис. 1), что свидетельствует об иммуногенности синтезированного пептида.

В образцах сыворотки крови, полученных от доноров, антитела к белку F ВГС определяли, используя метод ИФА. При отработке методики постановки ИФА была определена оптимальная концентрация пептида в составе иммуносорбента. Для этого в лунки планшета сорбировали синтетический пептид F10 в концентрациях 2; 5 и 10 мкг/мл. Иммуноную (ИМС) и нормальную мышшиные сыворотки (НМС) вносили в разведении 1:400 и измеряли ОП, используя конъюгат на основе козжих поликлональных антител к IgG мыши (рис. 2). Концентрация пептида для сорбции, при которой наблюдались максимальные различия между значениями ОП положительного образца и контрольных отрицательных образцов, не содержащих антител к ВГС, составила 5 мкг/мл.

Образцы сыворотки крови из 5 сформированных панелей проанализировали с учётом выбранных оптимальных параметров постановки ИФА. Доля обнаружения положительных образцов сыворотки крови с КП более 2,0 для каждой панели приведена в табл. 1. Антитела к белку F не определялись в анти-ВГС-негативных/анти-ВИЧ-негативных/НВsAg-негативных образцах сыворотки крови, а также среди анти-ВИЧ-позитивных/анти-ВГС-негативных, НВsAg-позитивных/анти-ВГС-негативных образцов. На основании критерия хи-квадрат (табл. 2) статистически значимых различий между образцами сыворотки крови панелей № 1 и № 2 не выявлено ( $\chi^2 = 2,1876$ ;  $p = 0,139$ ).

Положительные образцы из панели № 1 были пулированы. Аналогично пулированы положительные образцы из панели № 2 и отрицательные образцы из панели № 5. Для доказательства специфичности синтезированного пептида F10 проведён ИФА с предварительной блокировкой пептида F10 иммуноной мышшиной сывороткой. Для этого в лунки планшета с сорбированным пептидом вносили растворы им-

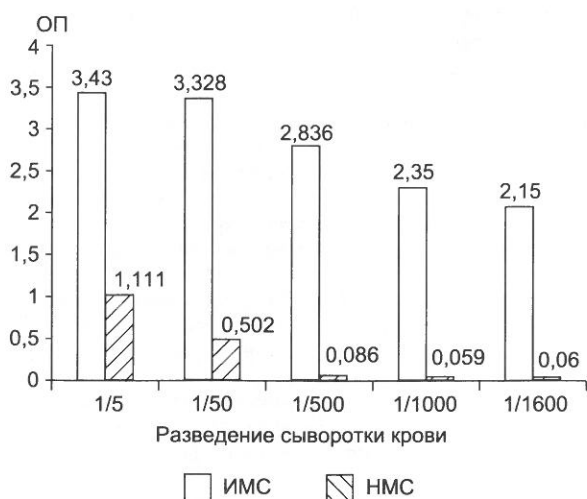


Рис.1. Показатели ОП при различных разведениях образцов иммуноной мышшиной сыворотки (ИМС) и неиммуноной мышшиной сыворотки крови (НМС).

мунной и неиммунной мышинной сыворотки крови в разведении 1:400. Инкубировали 45 мин при температуре 37°C, отмывали планшет раствором ФСП-Т 5 раз и далее проводили анализ, как описано выше. Как показано на рис. 2, ИМС блокирует сайты связывания сорбированного пептида и снижает значения ОП для положительных образцов из панелей № 1 и № 2, что доказывает специфичность пептида F10.

**Заключение.** В ходе проведённого исследования оптимизированы основные параметры постановки ИФА для обнаружения антител к синтетическому пептиду F10, соответствующему антигенной детерминанте белка F/core+1/ARFP изолятов ВГС субтипа 1b. Доказана иммуногенность и иммунохимическая активность синтетического пептида F10.

**Финансирование.** Исследование частично поддержано грантом молодых учёных ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6-8 см. REFERENCES)

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 10 выпуск. Покровский В.И., Тотолян А.А., ред. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016.
2. Калинина О.В., Дмитриев А.В. Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита С. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 2: 9-12.
5. Калинина О.В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции вируса гепатита С. Дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2013.

#### REFERENCES

1. *Viral hepatitis in Russian Federation. Analytical review. 10th edition.* [Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii. Analiticheskiy obzor. 10 vypusk]. Pokrovskiy V.I., Totolyan A.A., eds. St.Peterburg: Nauchno-issledovatel'skiy institute epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera, 2016. (in Russian)
2. Kalinina O.V., Dmitriev A.V. Structural and functional genome organization and life cycle of hepatitis C virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 2: 9-12. (in Russian)
3. Budkowska A., Kakkanas A., Nerrienet E., Kalinina O., Maillard P. et al. Synonymous Mutations in the Core Gene Are Linked to Unusual Serological Profile in Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*. 2011; 6(1): e15871.
4. Vassilaki N., Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 40503-13.
5. Kalinina O.V. Molecular genetic mechanisms of the evolution of the hepatitis C virus. Diss. St.Peterburg; 2013. (in Russian)
6. Li H.C., Ma H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(23): 7104-22.
7. Mavromara P., Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Vir.* 2011; 92: 1343-51.
8. Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A., Kochliou E. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (6): 1343-51.

Поступила 01.11.17  
Принята к печати 08.11.17