

На правах рукописи

Барышникова Виктория Сергеевна

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СЕРОДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВОГО
ЭНЦЕФАЛИТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА E**

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:

Тучинская Ксения Константиновна – кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Гущин Владимир Алексеевич – доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела эпидемиологии, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Файзулов Евгений Бахтиерович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией прикладной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Филimonковский, поселок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Филimonковский, поселок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1 и на сайте: <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Клещевой энцефалит (КЭ) – это вирусная трансмиссивная инфекция, переносимая преимущественно клещами рода *Ixodes*, вызванная вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), который принадлежит к роду *Orthoflavivirus* семейства *Flaviviridae*. Ежегодно в мире регистрируется около 10-15 тысяч случаев заболевания КЭ. ВКЭ эндемичен для регионов Европы и Азии, в том числе и России, и представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Выделяют три основных подтипа ВКЭ: европейский, сибирский и дальневосточный – все они циркулируют на территории России. Серодиагностика играет решающее значение в постановке диагноза КЭ на разных стадиях инфекции и для дифференцирования этиологического агента от других ортофлавивирусов.

В рутинной диагностике ключевую роль в выявлении острого КЭ играет обнаружение антител класса IgM и/или IgG в сыворотках крови или спинномозговой жидкости (СМЖ) с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), особенно на стадиях инфекции, когда вирусная РНК или вирусный антиген в сыворотках крови уже не обнаруживаются. Наличие IgM антител может указывать на свежую инфекцию. Наличие низких титров IgG антител может свидетельствовать о прошлом контакте с возбудителем или о предшествующей вакцинации, а повышение титров IgG антител – о свежей инфекции. Кроме того, на уровень IgG антител могут влиять такие факторы, как особенности иммунного ответа человека и время, прошедшее с момента заражения. Коммерческие наборы для серодиагностики, используемые в России, способны выявить и подтвердить КЭ на ранней стадии, позволяя вовремя принять верную стратегию лечения, снижая риск развития неврологических осложнений. ИФА для выявления IgG антител к ВКЭ широко используется благодаря своей простоте, масштабируемости и отсутствию дополнительных требований к безопасности во время анализа. В настоящее время большинство ИФА тест-систем используют в качестве антигена инактивированные цельные вирионы. Во всем мире в ряде исследований были отмечены проблемы, связанные с чувствительностью и специфичностью таких тест-систем.

В последние годы отмечается расширение ареала ВКЭ как в Европе, так и в России. При этом всё чаще ареал ВКЭ пересекается с ареалом других ортофлавивирусов, таких как вирус Западного Нила (ВЗН), вирус японского энцефалита (ВЯЭ), вирус Омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ). Кроме того, развитие туризма способствует увеличению количества завозных случаев ортофлавивирусных инфекций: лихорадка денге, Зика и других, не характерных для РФ ортофлавивирусов. Перекрёстная реактивность постинфекционных антител к другим ортофлавивирусам часто приводит к ложноположительным результатам в коммерческих ИФА, усложняя дифференциальную серодиагностику КЭ, а также может приводить к постановке ложноположительного диагноза КЭ у пациентов, ранее перенесших инаппарантную форму ортофлавивирусной инфекции или вакцинированных против других ортофлавивирусов. Все вышеперечисленное указывает на необходимость проведения более специфических диагностических анализов, таких как реакция нейтрализации (РН) в культуре клеток, в специализированных лабораториях.

Таким образом, коммерческие диагностические ИФА для выявления антител к ВКЭ, которые используются в данный момент, имеют ряд недостатков и требуют значительного повышения специфичности и чувствительности для выявления анти-ВКЭ антител. Для повышения точности диагностики, выбора тактики лечения КЭ во всем мире необходимы

детальные исследования и разработка новых подходов к дифференциальной серодиагностике ВКЭ.

Степень разработанности темы исследования

Существующие коммерческие ИФА наборы, такие как Вектор-Бест (Россия), Euroimmun (Германия) и др. успешно используются для выявления IgM и IgG антител к ВКЭ при диагностике заболевания и оценке иммунной прослойки. В настоящее время подавляющее большинство таких тест-систем основаны на использовании инаktivированного цельновирионного антигена ВКЭ. Сравнительные исследования показали, что ИФА на основе инаktivированных вирусов может обладать хорошей чувствительностью, но при этом страдать от проблем перекрестной реактивности. Например, оценка ИФА Immunozyt, в котором используются инаktivированные антигены ВКЭ, показала чувствительность 83% и специфичность 49% при исследовании человеческих сывороток, при этом низкая специфичность обусловлена перекрестными реакциями с другими ортофлавивирусами. Таким образом, основным недостатком таких тест-систем является низкая специфичность.

На решение проблемы низкой специфичности существующих ИФА-наборов для выявления антител к ВКЭ направлены многие исследования по всему миру. Большинство из них в качестве антигена используют рекомбинантные домены белка Е либо субвирусные частицы ВКЭ. В Европе существует коммерчески доступный рекомбинантный белок Е ВКЭ штамма Neudoerfl европейского подтипа, который может быть использован в ИФА тест-системах. Однако его специфичность была проверена только при использовании сывороток пациентов из Европы, что не дает представление о спектре выявляемых антител против ВКЭ. Было показано, что рекомбинантные субвирусные частицы (prM/E-SP), включающие белок Е, могут успешно использоваться в качестве антигена в ИФА для выявления IgG и IgM антител к ВКЭ, однако такая система была проверена на кросс-реактивность только с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ. Аналогично, ИФА на основе рекомбинантных prM/E частиц, экспрессированных в клетках млекопитающих, продемонстрировал хорошие результаты при исследовании сывороток, содержащих антитела к ВКЭ, в сравнении с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ или вирусу Семлики Форест. Также исследователями был изучен диагностический потенциал домена III белка Е (rE-D3) ВКЭ как более специфичного антигена для дифференциации антител к ВКЭ от антител против ортофлавивирусов, переносимых комарами. Тем не менее, нет данных, что полученный антиген смог специфично выявлять антитела к ВКЭ среди антител к другим ортофлавивирусам, переносимым клещами. В дополнение к этому, в другом исследовании был получен белок Е ВКЭ соединенный с Fc-доменом кроличьего IgG в качестве антигена для ИФА. Такая система ИФА показала специфичность при выявлении анти-ВКЭ антител в сыворотках грызунов и людей в сравнении с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ. Эти разработки демонстрируют растущий интерес к использованию различных форм белка Е в качестве антигена для ИФА, однако многие из них остаются на уровне исследовательских наборов и требуют дальнейшей валидации на больших клинических панелях. Всё это подчеркивает необходимость разработки подходов к созданию диагностических систем и их проверки на большом материале для эффективного и специфичного обнаружения антител ко всем подтипам ВКЭ.

Целью данной работы является создание диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных доменов белка Е ВКЭ для дифференциальной серодиагностики.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получение рекомбинантных доменов (sE, dI+II, dIII) белка E вируса клещевого энцефалита, создание диагностической методики иммуноферментного анализа на основе полученных антигенов для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита.

2. Изучение способности полученных рекомбинантных доменов белка E связываться с антителами к широкому набору штаммов вируса клещевого энцефалита, относящихся к разным подтипам, изолированным в разное время из разных источников и регионов с использованием сывороток лабораторных животных.

3. Оценка специфичности разработанной диагностической методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII с использованием сывороток лабораторных животных, содержащих антитела к различным ортофлавивирусам.

4. Оценка чувствительности и специфичности полученной диагностической методики иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках пациентов с диагнозами клещевой энцефалит, японский энцефалит, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, лихорадка денге и реципиентов, вакцинированных против клещевого энцефалита и желтой лихорадки.

Научная новизна

Впервые были получены рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII на основе штамма Сухар ВКЭ сибирского подтипа, широко распространенного на территории РФ, и sE вакцинного штамма Софьин дальневосточного подтипа и отработаны условия их получения. Впервые с использованием большого набора сывороток крови людей и лабораторных животных показана способность диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII выявлять антитела против широкого спектра штаммов ВКЭ, изолированных в разных регионах РФ и Европы. Впервые для рекомбинантного белка sE ВКЭ (штамм Сухар) как антигена для ИФА показана высокая чувствительность без потери специфичности. Рекомбинантный белок sE ВКЭ штамма Сухар позволяет дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к ортофлавивирусам: ВЗН, вирусу Лангат, ДЕНВ, вирусу Повассан (ВПОВ), вирусу желтой лихорадки (ВЖЛ), вирусу Зика, ВЯЭ. Впервые разработана диагностическая методика ИФА на основе рекомбинантных белков ВКЭ (sE, dIII, штамм Сухар), способная специфично выявлять антитела к ВКЭ в сыворотках людей на фоне уже имеющихся антител к другим ортофлавивирусам. Впервые на наборе сывороток, полученных от разных организмов, показана диагностическая значимость разных доменов белка E ВКЭ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан протокол очистки рекомбинантных белков ВКЭ, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность при использовании их в качестве антигенов в ИФА. Отработана схема проведения ИФА для выявления антител к ВКЭ на основе рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII ВКЭ. Показано, что диагностическая методика ИФА на основе рекомбинантного белка sE способна специфично дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к ортофлавивирусам переносимых как клещами, так и комарами. Разработанный диагностический метод ИФА может быть основой при создании коммерческого набора для дифференциальной серодиагностики ВКЭ.

Методология и методы исследования

Решение задач опиралось на обширную теоретическую базу и современные практические вирусологические, молекулярные, молекулярно-генетические, иммунологические и иммунохимические методы. Основным научный подход состоял в получении рекомбинантных антигенов sE, dI+II, dIII белка E ВКЭ для последующей разработки диагностической методики

ИФА по дифференциальной серодиагностике КЭ. Валидация специфичности разработанной тест-системы проведена с использованием широкого набора сывороток лабораторных животных и людей, содержащих антитела к ВКЭ, ВЗН, ВОГЛ, ВЯЭ, ВЖЛ, ДЕНВ, вирусу Зика, ВПОВ, вирусу Лангат и вирусу Чикунгунья. Проведена оценка диагностической значимости полученной лабораторной ИФА тест-системы в качестве альтернативы используемым методикам ИФА на основе цельновирионного антигена.

Положения, выносимые на защиту

1. Схема получения рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа, включающая экспрессию в бактериальной системе с 0,5 мМ индуктором (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), солюбилизацию с 6 М мочевиной, выделение на никелевом сорбенте с концентрацией имидазола 150 мМ и обессоливание, обеспечивает синтез белков в количестве и качестве, пригодном для иммуноферментного анализа.

2. Использование рекомбинантных белков sE и dIII штамма Сухар вируса клещевого энцефалита в качестве антигенов для иммуноферментного анализа обеспечивает высокую чувствительность при выявлении антител к широкому спектру штаммов, принадлежащих к основным подтипам вируса клещевого энцефалита (европейский, дальневосточный, сибирский, байкальский-1, байкальский-2) в сыворотках лабораторных животных.

3. Разработанная диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе доменов sE и dIII белка E штамма Сухар вируса клещевого энцефалита позволяет дифференцировать антитела к вирусу клещевого энцефалита от антител к другим ортофлавивирусам: в сыворотках лабораторных животных – от антител к вирусу Западного Нила, вирусу Омской геморрагической лихорадки, вирусу японского энцефалита, вирусу Повассан, вирусу Лангат; в сыворотках людей – от антител к вирусу японского энцефалита, вирусу Западного Нила, вирусу Зика, вирусу денге, а также от антител, индуцированных вакциной против вируса желтой лихорадки.

4. Антитела к dI+II белка E вируса клещевого энцефалита выявляются в сыворотках обезьян и людей и не выявляются в сыворотках мышей и кроликов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 7 и 10 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов в ходе работы подкрепляется теоретической базой, достаточным числом проведенных исследований, выполненных с использованием современных методов, и статистической обработкой результатов. Все выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы. Материалы исследования были представлены на российских и международных конференциях: XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», Москва, Россия, ноябрь 2020; XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021», Москва, Россия, апрель 2021; XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2022», Москва, Россия, апрель 2022; Конгресс «Молекулярная диагностика и биобезопасность 2023», Москва, апрель 2023; Международное научно-практическое мероприятие «OpenBio - 2023», Кольцово, Россия, сентябрь 2023; Международная конференция «WSV 2025 The virosphere of our cellular world» Малайзия, Куала-Лумпур, май 2025.

Личное участие автора в получении результатов

Автором была проведена работа по изучению литературы, поставлены цель и задачи исследования, построен дизайн экспериментов. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Разработка праймеров и получение конструкций, кодирующих целевой ген, выполнены в сотрудничестве с младшим научным сотрудником лаборатории биохимии Турченко Юрием Владиславовичем. Реакцию секвенирования проводил научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов к.б.н. Холодилов Иван Сергеевич. Культуру эмбриональных клеток почки свиньи (СПЭВ) культивировала и любезно предоставила Рогова Анастасия Андреевна, научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов.

Автор лично сформулировал основные положения и выводы диссертации. С участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, RSCI, PubMed, соответствующих требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 137 страницах и состоит из введения, 3-х глав основной части диссертации: обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, благодарности, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа содержит 295 источников, иллюстрирована 18 таблицами и 43 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы ВКЭ пяти подтипов (европейский, сибирский, дальневосточный, байкальский-1 и байкальский-2), распространенных на территории РФ и Европы. Были получены сыворотки от лабораторных животных (мышей, кроликов и обезьян). Исследования проводили с использованием коллекций сывороток человека, включавшей образцы от пациентов с подтверждённым диагнозом КЭ, вакцинированных против КЭ людей, а также сыворотки пациентов с инфекциями вызванными другими ортофлавирусами.

Для получения рекомбинантных антигенов sE, dI+II, dIII выделяли вирусную РНК, проводили обратную транскрипцию, амплификацию и клонирование целевых фрагментов гена белка Е ВКЭ в экспрессионные плазмиды семейства pQE. Полученные конструкции экспрессировали в клетках *E. coli* штамм JM109, после чего рекомбинантные белки выделяли, очищали методом металл-аффинной хроматографии, подвергали рефолдингу и анализировали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле.

Антигенные свойства рекомбинантных белков изучали с помощью вестерн-блоттинга и ИФА с использованием сывороток человека и животных. Для оценки функциональной активности антител применяли реакцию нейтрализации 50% бляшек в культуре клеток. Полученные рекомбинантные антигены использовали при анализе разработанной диагностической методики ИФА для специфичного выявления антител к ВКЭ и анализа перекрёстной реактивности с другими ортофлавирусами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование рекомбинантных белков в качестве антигенов представляет собой перспективную альтернативу коммерческим ИФА тест-системам на основе цельновирионного антигена ВКЭ, поскольку такие подходы характеризуются более простой технологией получения, масштабируемостью и безопасностью приготовления. Это особенно важно в условиях расширения ареалов ортофлавивирусов и увеличения числа завозных инфекций, что требует повышения специфичности дифференциальной серодиагностики. Несмотря на широкое применение ИФА, существующие цельновирионные тест-системы для определения антител к ВКЭ нередко обладают недостаточной специфичностью вследствие перекрёстной реактивности, обусловленной наличием кросс-реактивных эпитопов в белке Е. В связи с этим актуальным направлением является использование отдельных доменов белка Е для повышения специфичности анализа. В настоящей работе в качестве основы для получения рекомбинантных антигенов выбран штамм Сухар ВКЭ сибирского подтипа, широко распространённого на территории Российской Федерации, а также вакцинный штамм Софьин дальневосточного подтипа.

1.1 Особенности структуры рекомбинантных белков sE и dI+II штамма Сухар

Рекомбинантные белки dI+II и sE штамма Сухар получали без одного цистеина на N-конце. Вторичную структуру белка sE штамма Сухар предсказывали при помощи программы AlphaFold 2 (версия v2.3.2 от DeepMind совместно с ColabFold) в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Для оценки разницы вторичной структуры белков Е ВКЭ штамма Сухар с цистеином на N-конце (Рисунок 1 (А) и 1 (А1)) и без него (Рисунок 1 (Б) и 1 (Б1)) проводили визуальное сравнение части белка.

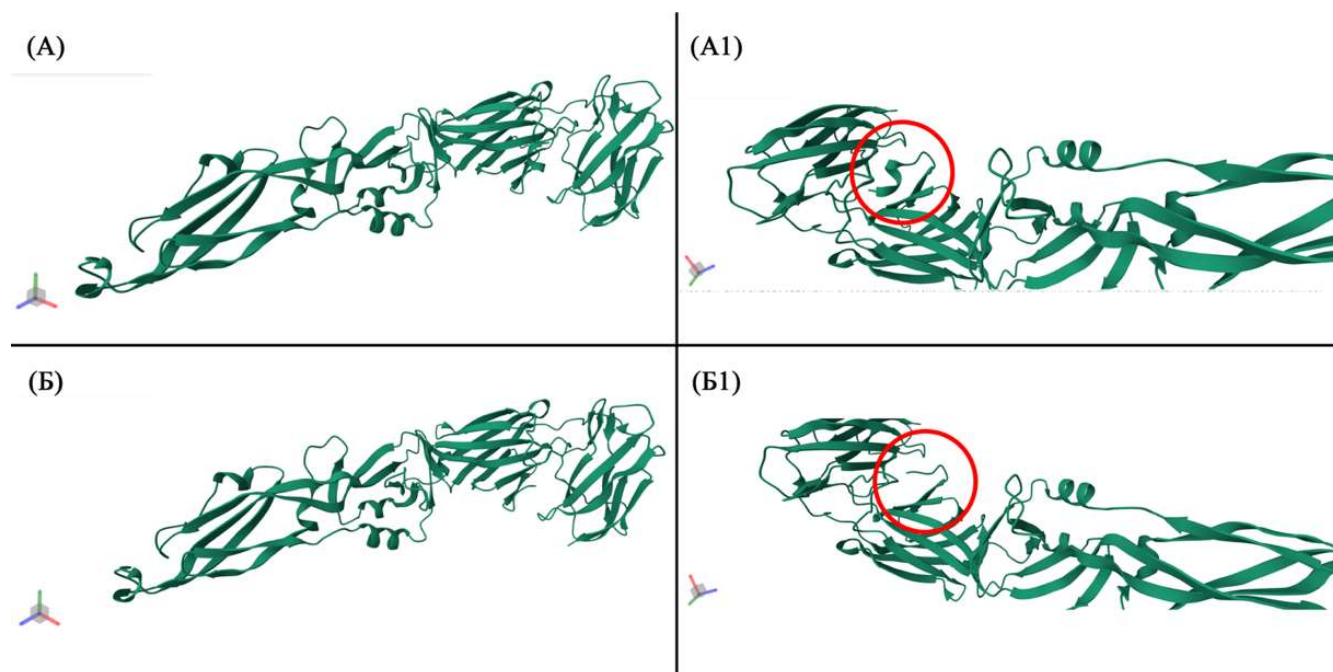


Рисунок 1 – Вторичная структура белка sE штамма Сухар, предсказанная с помощью программы AlphaFold 2 в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Вторичная структура белка с наличием цистеина (А), увеличенный участок (А1), представляющий наличие цистеина (отмечено красным): score – 0,85 (pLDDT – 96.15). Вторичная структура в отсутствии цистеина (Б), увеличенный участок (Б1), представляющий отсутствие цистеина (отмечено красным): score – 0,85 (pLDDT – 95.88)

Аналогично предсказывали вторичную структуру рекомбинантного белка dI+II, без цистеина на N-конце (Рисунок 2 (Б)) и с цистеином (Рисунок 2 (А)).

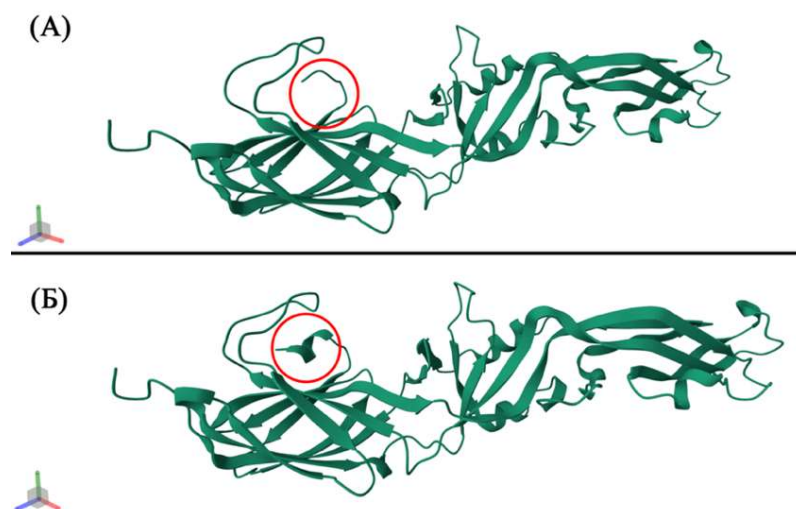


Рисунок 2 – Вторичная структура белка dI+II штамма Сухар, предсказанная с помощью программы AlphaFold 2 в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Для вторичной структуры с цистеином (отмечено красным) (Б) score – 0,84 (pLDDT – 95.64), для структуры в отсутствии цистеина (отмечено красным) (А) score – 0,84 (pLDDT – 95.50)

Сравнение структур показало, что удаление остатка цистеина на N-конце рекомбинантных белков sE и dI+II приводит к исчезновению N-концевой альфа-спирали, что, предположительно, делает данный участок белка более открытым.

1.2 Получение целевых участков генов и конструкций, кодирующих рекомбинантные белки

На основании последовательности белка Е штамма Сухар ВКЭ были подобраны праймеры для амплификации участков, кодирующих домен III (dIII), домены I+II (dI+II) и эктодомен (sE) белка Е ВКЭ. Как было отмечено ранее, в конструкциях, кодирующих белки sE и dI+II, отсутствовал N-концевой цистеин. Считается, что в домене I+II содержится большинство перекрёстно-реактивных эпитопов, однако в нём находятся и видоспецифичные эпитопы. Домен III был выбран на основании предыдущих работ, где данный антиген успешно применяли для специфической серологической диагностики различных ортофлавивирусных инфекций. Был также клонирован растворимый участок белка Е – sE штамма Софьин с цистеином на N-конце. Ожидаемая молекулярная масса белков составляла: sE – 44 кДа, dI+II – 33 кДа и dIII – 11 кДа.

В качестве векторов для работы были выбраны плазмиды группы pQE (pQE-30, pQE-32 и pQE-60), компетентные для экспрессии белков в бактериальной системе *E. coli*, благодаря наличию лактозного оперона (*lacO*), который позволяет контролировать экспрессию встраиваемого гена. Гены, кодирующие целевые белки, были фланкированы последовательностью, кодирующей гистиридиновый тег (6×His), содержащийся в векторе, что позволило в дальнейшем использовать метод аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе для выделения рекомбинантных белков из бактериального лизата. Ампликоны штамма Сухар клонировали по сайтам рестрикции BglII и NcoI для sE и dI+II, используя вектор pQE-60, и по сайтам рестрикции HindIII и SacI для dIII, используя вектор pQE-30. Для получения конструкции, содержащей целевой ген рекомбинантного белка sE штамма Софьин, использовали плазмиду pQE-32 (Рисунок 3).

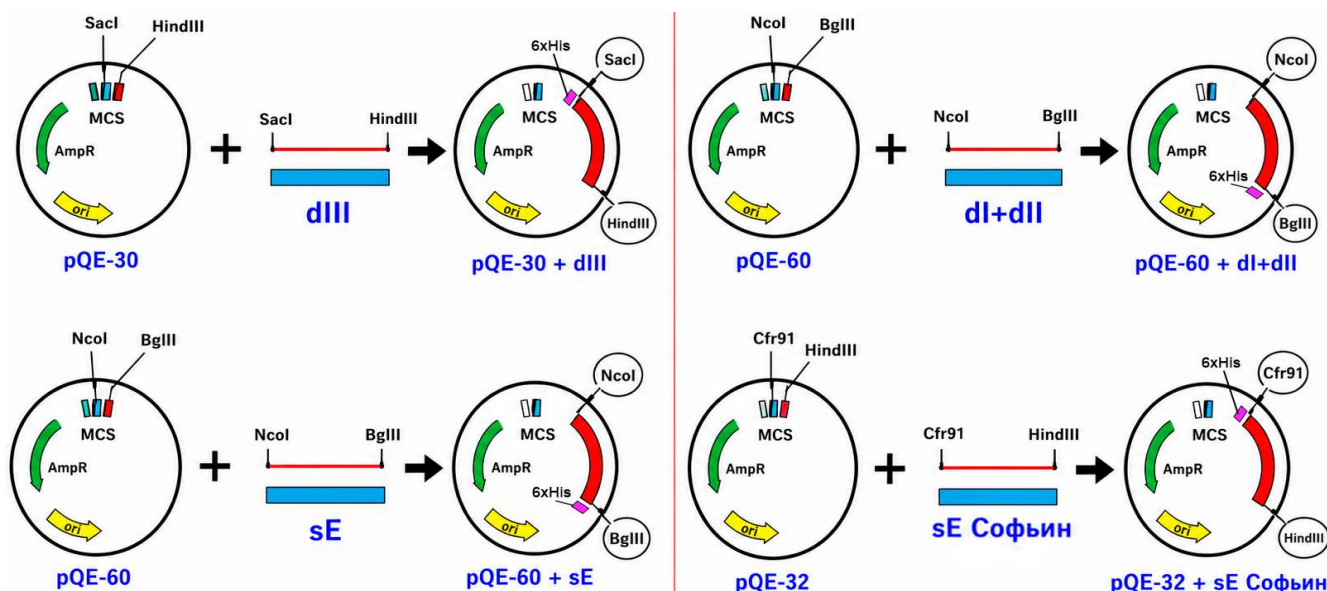


Рисунок 3 – Схема получения векторных конструкций

1.3 Оптимизация условий получения рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин

Для эффективного получения рекомбинантных белков в бактериальных системах экспрессии важным этапом является выбор оптимальной питательной среды. Наиболее широко применяются среды LB, SOB и TB, различающиеся по составу. При этом выбор среды зависит от свойств целевого белка и условий экспрессии и не гарантирует повышения растворимости или чистоты продукта.

При выборе оптимальной среды для экспрессии рекомбинантного белка sE штамма Сухар ВКЭ, клетки культивировали в среде LB, SOB или TB до оптической плотности 0,6 (600 нм), после чего индуцировали экспрессию 0,5 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Полученную биомассу подвергали ультразвуковой деструкции с последовательным использованием буферов без и с 8 М мочевиной. Уровень продукции целевого белка оценивали денситометрически после электрофореза в 12%-ном ПААГ (Рисунок 4), что позволило определить оптимальные условия культивирования.

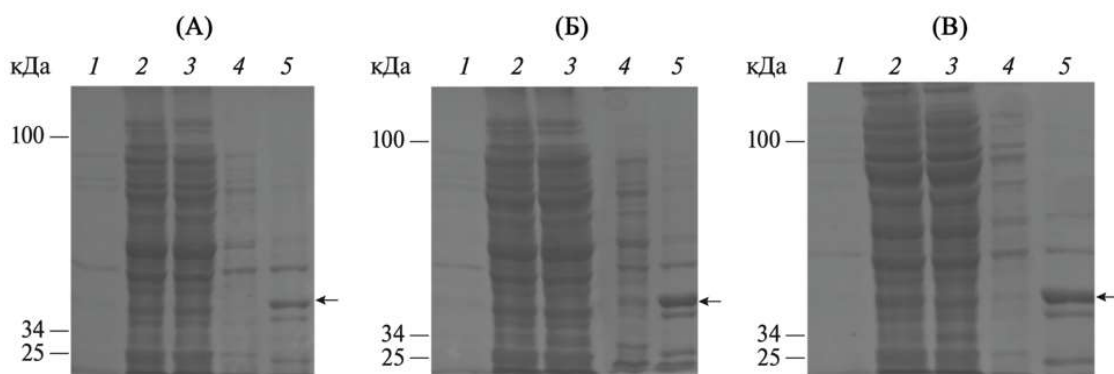


Рисунок 4 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ продукции рекомбинантного белка sE (44 кДа) штамм Сухар ВКЭ в клетках *E. coli*. Для экспрессии белка в клетках *E. coli* использована питательная среда LB (А), SOB (Б) или TB (В). Суспензия клеток до индукции (1), лизированные клетки (2), супернатант после первой (3), второй (4) и третьей (5) солиubilизации телец включения в 8 М мочеvine. Гели окрашены Кумасси R-250. Стрелками указан целевой белок. Денситометрия целевого белка sE: 50759 (А), 70116 (Б), 106561 (В)

Для целевого рекомбинантного белка sE штамма Сухар ВКЭ (44 кДа) была выбрана среда ТВ для культивирования клеток-продуцентов *E. coli* JM 109. Для рекомбинантных белков dI+II и dIII также использовали среду ТВ.

В системах экспрессии белков в *E. coli* с использованием *lac*-промотора индукция синтеза целевого белка осуществляется с помощью ИПТГ. Концентрация индуктора является ключевым параметром, влияющим на уровень экспрессии и физиологическое состояние клеток.

В работе проведено сравнение эффективности экспрессии рекомбинантного белка sE штамма Сухар при использовании умеренной (0,5 мМ) и высокой (5 мМ) концентраций ИПТГ (Рисунок 5).

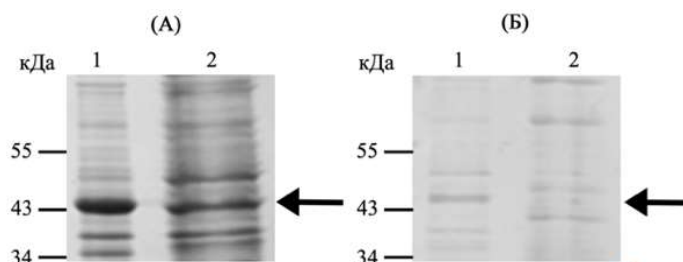


Рисунок 5 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белка sE (44 кДа) штамм Сухар ВКЭ (указан стрелкой) после индукции 0,5 мМ (А) и 5 мМ (Б) ИПТГ. На дорожки нанесены: клеточный осадок после индукции (1) и супернатант после индукции клеток (2)

Подобранная концентрация ИПТГ составила 0,5 мМ для белка sE штамма Сухар. Для подбора условий оптимальной концентрации ИПТГ для синтеза белка sE штамма Софьин, отталкивались от данных, полученных для белка sE штамма Сухар. Индукцию экспрессии белка проводили разными концентрациями ИПТГ (0,5 мМ, 0,25 мМ и 0,1 мМ) и солюбилизировали синтезированный белок в присутствии 6 М мочевины, после чего центрифугировали клеточную суспензию и оценивали визуально супернатант в ПААГ. По результатам денситометрической оценки электрофореза в ПААГ была выбрана оптимальная концентрация ИПТГ для индукции белка sE штамма Софьин, которая составила 0,5 мМ. Для рекомбинантных белков dI+II и dIII использовали такую же концентрацию ИПТГ.

При экспрессии белков в *E. coli* одной из основных проблем является образование телец включения — нерастворимых агрегатов неправильно свернутого белка. Для их солюбилизации применяют хаотропные агенты, в частности мочевины в концентрации 6–8 М, с последующим рефолдингом белка. Максимальный выход исследуемых рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар достигали при использовании 6 М мочевины, что подтверждено денситометрическим анализом после электрофореза в ПААГ (Рисунок 6).

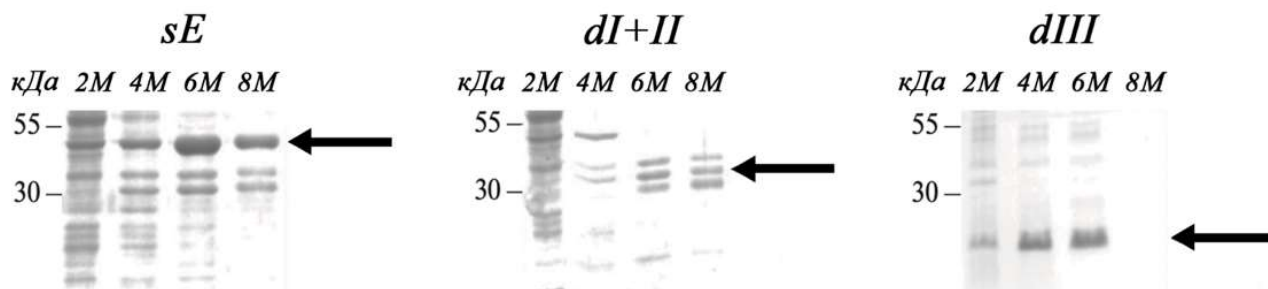


Рисунок 6 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар (указаны стрелками) после солюбилизации разными концентрациями мочевины для извлечения целевых белков из телец включения. На дорожки нанесены: супернатант после солюбилизации с 2 М (3), 4 М (4), 6 М (5) и 8 М (6) мочевиной

Условия солюбилизации для белка sE штамма Софьин подбирали аналогично условиям для белка sE штамма Сухар. Выбранная концентрация мочевины также составила 6 М. Следует уточнить, что выбранная концентрация 6 М была оптимальной для дальнейшей аффинной хроматографии с использованием гравитационных колонок, в которых визуально изменялся цвет сорбента при использовании 8 М мочевины.

При очистке His-меченых белков методом аффинной хроматографии на Ni-NTA или кобальтовых смолах имидазол используют для конкурентного вытеснения белка. В работе концентрацию имидазола в буфере элюции варьировали в диапазоне 50–300 мМ с шагом 50 мМ, что позволило подобрать условия эффективного выделения белка с сохранением его чистоты и минимизации влияния остаточного имидазола на последующие ИФА-анализы. Для белка sE штамма Сухар выбранная оптимальная рабочая концентрация имидазола в элюирующем буфере, используемом на аффинном сорбенте, составила 150 мМ. Такую же концентрацию имидазола использовали для выделения белков dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин. Рефолдинг осуществляли путём смены буфера с использованием колонок Hi-Trap Desalting Column (Cytiva, Швеция) для всех рекомбинантных белков (sE, dI+II и dIII штамм Сухар) и методом смены буфера при помощи центрифужных концентраторов Amicon с диаметром пор 30 кДа для белка sE штамма Софьин. Конечный объем всех рекомбинантных белков был одинаковым.

Выход белков с одного литра бактериальной культуры после описанных выше стадий их получения оценивали с использованием калибровки БСА по интенсивности полос в ПААГ после окрашивания Кумасси (Рисунок 7) с помощью пакета программ Genesys Tool.

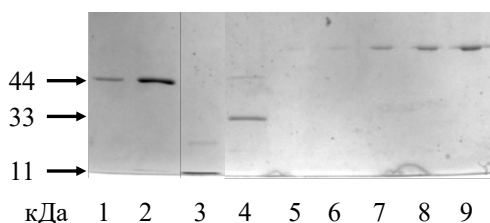


Рисунок 7 – Электрофорез в 15% ПААГ сконцентрированных рекомбинантных белков sE (44 кДа) в двух разведениях: с разведением в 200 раз (дорожка 1) и в 20 раз (дорожка 2); dIII (11 кДа) в разведении в 200 раз (дорожка 3); dI+II (11 кДа) в разведении в 200 раз (дорожка 4) (указаны стрелками); концентрации БСА: 0,0025 мг/мл (дорожка 5), 0,005 мг/мл (дорожка 6), 0,025 мг/мл (дорожка 7), 0,05 мг/мл (дорожка 8), 0,1 мг/мл (дорожка 9)

Концентрации полученных рекомбинантных белков с 1 литра бактериальной культуры составляли: sE – 3,103 г/л, dI+II – 7,884 г/л, dIII – 7,089, sE (Софьин) – 0,747.

Несмотря на отсутствие гликозилирования, рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII сохраняли свои антигенные свойства. Их способность связываться с антителами к ВКЭ оценивали методами иммуноблоттинга и ИФА с сывороткой человека, после двукратной иммунизации вакциной Клещ-Э-Вак. Для подбора оптимальной концентрации белков в качестве антигенов в ИФА с сывороткой, содержащей антитела к ВКЭ, была построена кривая зависимости оптической плотности от концентрации белка и выбрана точка на верхнем плато. Концентрация для рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII составила 12 нг на лунку.

В связи с более низкой эффективностью белка sE штамма Софьин по сравнению с белком sE штамма Сухар в ИФА в дальнейшей работе его не использовали (Рисунок 8).

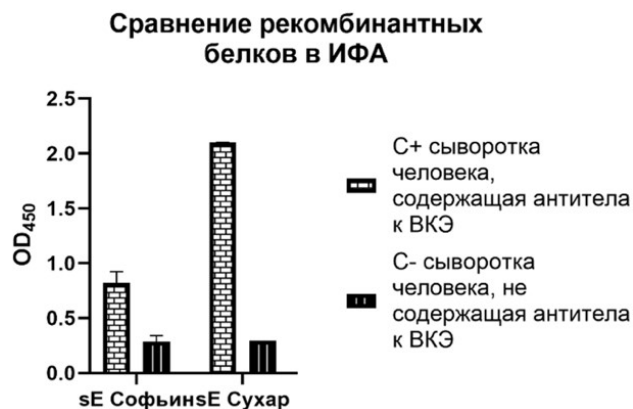
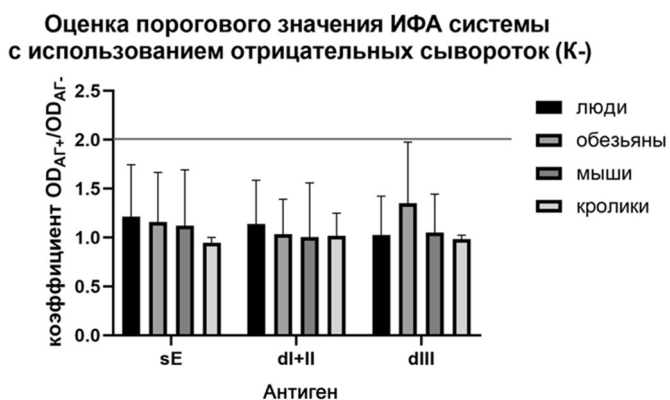


Рисунок 8 – ИФА при использовании в качестве антигенов белков sE штамма Сухар и sE штамма СофьинсЕ Сухар с сыворотками: C+ – сыворотка человека после двукратной иммунизации вакциной Клещ-Э-Вак, C- – сыворотка невакцинированного от ВКЭ, условно здорового человека

1.4 Выявление антител против вируса клещевого энцефалита с помощью диагностической методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар

Для отсека отрицательных значений в разработанной методике ИФА использовали панели отрицательных сывороток человека и животных. Результат выражали в виде коэффициента К, который рассчитывали как отношение $OD_{(AG+)} / OD_{(AG-)}$, где (AG+) представлял собой один из рекомбинантных белков (sE, dI+II и dIII штамма Сухар), а (AG-) — контрольный антиген, полученный при аналогичных этапах очистки и концентрирования из клеток *E. coli*, трансформированных пустым вектором. Пороговое значение рассчитывали как среднее значение коэффициента для отрицательных сывороток плюс два стандартных отклонения (Рисунок 9). Такой подход позволял учитывать уровень неспецифического связывания и повышал надежность интерпретации результатов ИФА.



$$K = \frac{\overline{OD}_{AG+}}{\overline{OD}_{AG-}}$$

Рисунок 9 – Определение порогового значения диагностической методики ИФА с использованием набора отрицательных сывороток лабораторных животных и людей. Доверительные интервалы соответствуют двум стандартным отклонениям. Справа указана формула расчёта порогового значения

При интерпретации результатов ИФА учитывали межвидовые различия в уровне неспецифического связывания и характеристиках иммунного ответа. Для сывороток человека и различных лабораторных животных рассчитывали индивидуальные пороговые значения коэффициента К, однако во всех случаях критерием положительного результата считали значение коэффициента (К) $OD_{(AG+)} / OD_{(AG-)} \geq 2$. Валидность данного подхода была подтверждена

при исследовании панелей заведомо положительных и отрицательных сывороток, полученных из разных организмов (Рисунок 10).

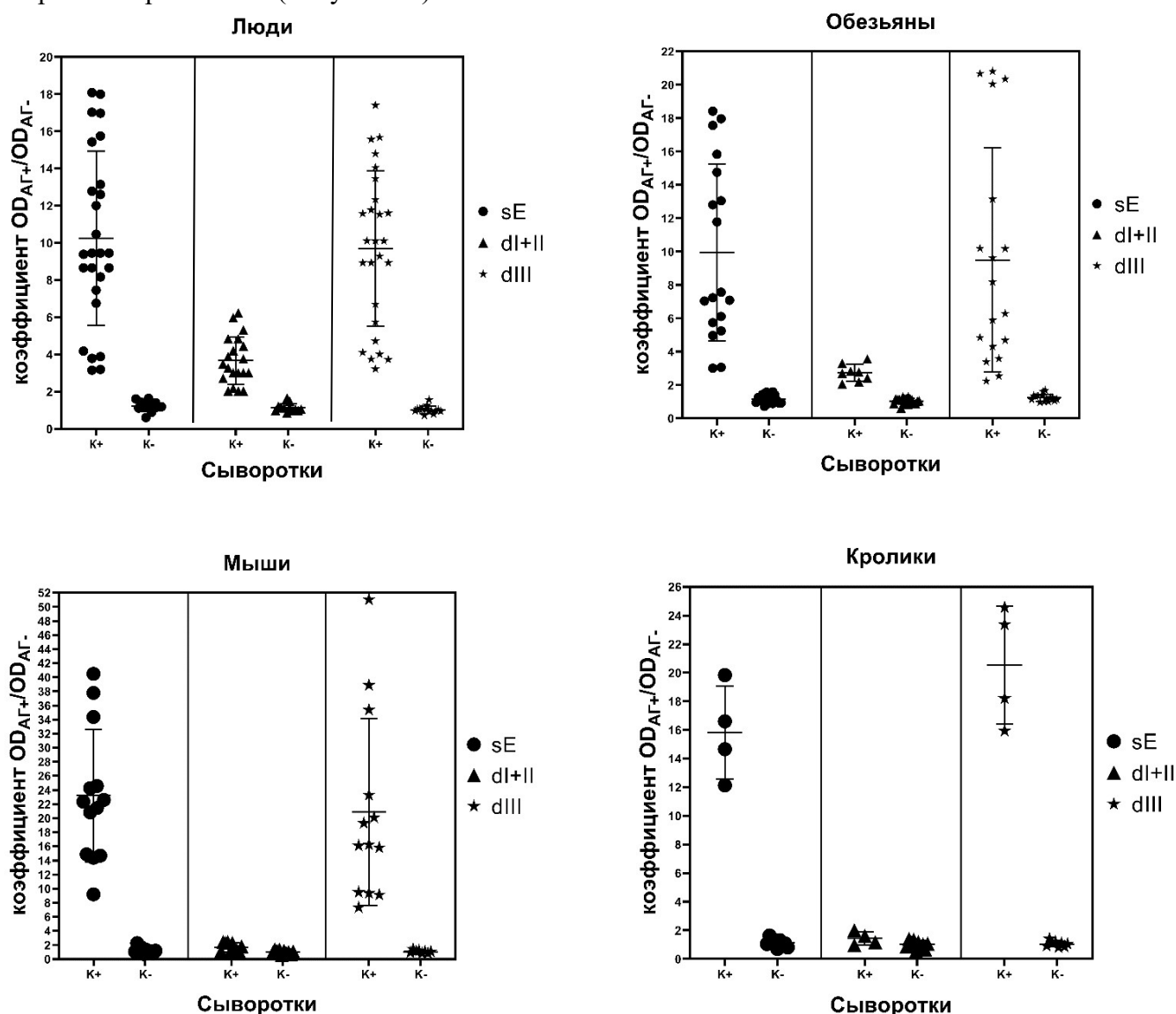


Рисунок 10 – Оценка валидности порогового значения диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dIII и dI+II при исследовании положительных (K+), содержащих антитела к ВКЭ, и отрицательных (K-), не содержащих антитела к ВКЭ, сывороток крови лабораторных животных и людей. Доверительные интервалы соответствуют двум стандартным отклонениям

Чувствительность разработанной ИФА-методики оценивали с использованием гипериммунных асцитных жидкостей мышей и гипериммунных сывороток кроликов после трехкратной иммунизации соответствующим вирусом, содержащих антитела к одиннадцати штаммам ВКЭ, относящихся к различным подтипам. Все образцы, обладавшие нейтрализующей активностью (средний титр около 2,5 Ig), давали положительный результат в ИФА с рекомбинантными белками sE и dIII штамма Сухар. Для dI+II все образцы были отрицательны, что свидетельствует об отсутствии или низкой представленности антител к этим доменам в сыворотках мышей и кроликов. Ряд исследователей ранее отмечали отсутствие антител к доменам I и II у мышей при инфекции ВКЭ. Результаты показывают способность белков sE и dIII выявлять антитела к широкому спектру штаммов ВКЭ (Таблица 1).

Таблица 1 – Титры антител, определенные в РН и результаты ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII при исследовании ИАЖ, содержащих антитела к разным штаммам ВКЭ

От кого получена ИАЖ	Подтип	Штамм	Титр НАТ против соответствующего вируса, Ig(НАТ)	ИФА (sE)	ИФА (dI+II)	ИФА (dIII)
Мышь	Европейский	Absettarov	2,95 *	+	–	+
	Европейский	MOS-152-N-2017	1,9	+	–	+
	Сибирский	VK476	2,94	+	–	+
	Сибирский	ZauPVV	1,9	+	–	+
	Сибирский	Karl14-T20468	2	+	–	+
Кролик	Дальневосточный	256	н/т	+	–	+
	Сибирский	Yar-82	н/т	+	–	+
	Сибирский	Kurg-59	н/т	+	–	+

* – Разброс значений для РН с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10); ¹ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом LK-138; ² – титр НАТ был проверен в РН со штаммом EK-328; ³ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом SofjinKGG; «н/т» – не тестировали

Для определения диагностических возможностей рекомбинантных белков исследовали пулы сывороток мышей, полученные на 7-е сутки после заражения различными штаммами ВКЭ. В связи с отсутствием реакции с белком dI+II дальнейший анализ проводили только с рекомбинантными белками sE и dIII. На этом сроке IgG антитела выявлялись не во всех образцах, тогда как IgM антитела определялись значительно чаще, особенно при использовании антигена dIII (Таблица 2).

Таблица 2 – Исследование сывороток мышей на 7-е сутки после заражения разными штаммами ВКЭ в ИФА на основе белков sE и dIII

Подтип	Штамм	Титр НАТ против ВКЭ, Ig	ИФА IgG (sE)	ИФА IgM (sE)	ИФА IgM (dIII)
Европейский	Absettarov	н/т	+	+	+
	LK-138	1,25 * ¹	–	–	+
Сибирский	Yuk 4/13	1,07 ²	+	+	+
Дальневосточный	SofjinKGG	1,17 ³	+	–	–
	205	1,24 ³	+	+	+
	DV 936k	н/т	+	+	+
Байкальский-1	178–79	1,48 ²	–	–	+
Байкальский-2	886–84	1,45 ²	–	–	+

* – Разброс значений для РН с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10); ¹ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом LK-138; ² – титр НАТ был проверен в РН со штаммом EK-328; ³ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом SofjinKGG; «н/т» – не тестировали

Рекомбинантные белки sE и dIII штамма Сухар продемонстрировали высокую чувствительность при выявлении антител к широкому спектру штаммов ВКЭ, относящихся к различным подтипам. Они обеспечивали эффективное обнаружение как IgM, так и IgG антител в сыворотках мышей, что подтверждает их перспективность для создания диагностических ИФА тест-систем.

Для оценки диагностической эффективности разработанного ИФА использовали набор сывороток обезьян (все сыворотки обезьян были получены совместно с сотрудниками лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт

полиомиелита) Илларионовой В.В. и Роговой А.А.). Животных распределяли на группы: иммунизированные вакциной КЭ, экспериментально инфицированные ВКЭ и контрольные неинфицированные животные. До начала эксперимента сыворотки исследовали на наличие нейтрализующих антител к ВЗН, КЭ и ВПОВ. IgG антитела к рекомбинантным белкам sE, dI+II и dIII выявляли у животных с высокими титрами нейтрализующих антител к ВКЭ. После двукратной вакцинации препаратом Клещ-Э-Вак антитела к ВКЭ определялись у всех обезьян, тогда как в контрольной группе, которой вводили физиологический раствор, положительных результатов не зарегистрировано (Таблица 3).

Таблица 3 – Титры НАТ к ВКЭ и антител, выявленных в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII в сыворотках обезьян, зараженных ВКЭ либо вакцинированных вакциной КЭ

Группа	День после инфекции/вакцинации	Обезьяны	Анти-ВКЭ НАТ, lg	Антитела против dIII в ИФА, lg	Антитела против sE в ИФА, lg	Антитела против dI+II в ИФА, lg
ВКЭ	7	1	2,35	0	0	0
		2	4,49	3,98	3,9	3,93
		3	1,8	0	0	0
	10-14	1	3,23	0	0	0
		2	4,4	4,1	4,07	4,68
		3	1,84	0	0	0
ВКЭ вакцинированные	13	4	2,40	3,49	3,33	3,42
		5	2,70	3,75	3,3	3,53
Невакцинированные и незараженные	0	6	0	0	0	0
		7	0	0	0	0

Для оценки специфичности разработанного ИФА исследовали сыворотки обезьян, инфицированных ВПОВ, а также животных, предварительно двукратно иммунизированных вакциной против КЭ и затем заражённых ВПОВ. У обезьян, инфицированных только ВПОВ, антитела к рекомбинантным белкам sE, dI+II и dIII не выявлялись, несмотря на наличие низких титров перекрёстно реагирующих нейтрализующих антител к ВКЭ. В то же время у вакцинированных животных после введения вируса Повассан антитела к ВКЭ эффективно обнаруживались всеми тремя антигенами (Таблица 4).

Таблица 4 – Титры анти-ВКЭ НАТ и антител, выявленных в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII, в сыворотках обезьян, зараженных ВПОВ с иммунизацией вакциной КЭ и без неё

Группа	День после инфекции	Обезьяны	Анти-ВКЭ НАТ, lg	Антитела против dIII, lg	Антитела против sE, lg	Антитела против dI+II, lg
ВПОВ	7	8	1,3	0	0	0
		9	1,8	0	0	0
		10	н/т	0	0	0
Вакцинированные против ВКЭ + ВПОВ	2	4	2,40	0	0	0
		5	2,57	3,85	3,55	4,77
	4	4	2,98	4,02	4,02	4,41
		5	2,31	4,08	3,84	3,6
	7	4	3,04	4,92	4,84	5,58
		5	2,95	5,33	4,95	4,62
	10-14	4	4,17	4,45	4,6	4,87
		5	5,30	5,55	5,01	7,82
Отрицательные	0	6	0	0	0	0
		7	0	0	0	0

«н/т» – не тестировали

Полученные результаты подтверждают высокую специфичность разработанной ИФА-методики и диагностическую пригодность рекомбинантных белков при анализе сывороток приматов.

Для оценки эффективности полученных рекомбинантных белков в качестве антигенов для ИФА при исследовании сывороток человека использовали несколько наборов сывороток пациентов с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом КЭ из разных регионов России. Сыворотки были получены от пациентов на разных стадиях заболевания КЭ и в отдаленные сроки после перенесенного заболевания (от 4 дней до более чем года). Набор сывороток предоставили профессор, д.м.н. Бутенко А. М. и д.м.н. Ларичев В. Ф. из лаборатории биологии и индикации арбовирусов, отдела арбовирусов ФГБУ «Национальный научный центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ.

При исследовании сывороток пациентов с диагнозом КЭ разработанная диагностическая методика ИФА на основе рекомбинантного белка sE продемонстрировала высокую чувствительность: большинство образцов из различных клинических наборов были положительными 98% (52/53). Рекомбинантный белок dIII выявлял антитела менее эффективно в 66% случаев (35/53) и давал положительные результаты только в части сывороток, для белка dI+II положительный результат составлял 42% (3/7) (Таблица 5).

Таблица 5 – Эффективность выявления анти-ВКЭ антител в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII в сыворотках пациентов с диагнозом КЭ

Номер набора	Количество сывороток, <i>n</i>	ИФА (sE) С+/n	ИФА (dIII) С+/n
1	7	6/7	6/7
2	26	26/26	11/26
3	20	20/20	18/20

С+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

1.5 Изучение взаимодействия рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII с антителами к другим ортофлавивирусам в иммуноферментном анализе

Иммунные асцитные жидкости мышей, содержащие антитела к ВПОВ, ВОГЛ, вирусу Лангат и ВЗН, были протестированы в разработанной методике ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dIII и dI+II. Несмотря на высокие титры нейтрализующих антител к соответствующим ортофлавивирусам, все образцы дали отрицательный результат (Таблица 6).

Таблица 6 – Исследование мышиных сывороток, содержащих антитела против различных ортофлавивирусов, в РН и в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII

Вирус / штамм	Титр НАТ против соответствующего вируса, Ig(NAT)	ИФА (sE)	ИФА (dI+II)	ИФА (dIII)
ВКЭ / Absettarov	2,95	+	–	+
ВПОВ / Pow-24	>3,4	–	–	–
ВОГЛ / Nikitina	2,2	–	–	–
Вирус Лангат / TP-21 (Elantsev)	2,5	–	–	–
ВЗН / B958 (2 линия)	2,3	–	–	–

* – Разброс значений для РН 50% бляшек с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10); ** – Значение титра в РН 50% бляшек против ВОГЛ; «–» - антитела не выявлялись

Разработанная методика ИФА на основе рекомбинантных белков dIII и sE показала 100% специфичность при исследовании антител к ВПОВ, ВОГЛ, вирусу Лангат, ВЗН. Рекомбинантный белок dI+II также не сработал ни с одной мышьиной сывороткой. При анализе отсутствовала перекрёстная реактивность с другими исследуемыми ортофлавивирусами (Таблица 6).

В условиях расширения ареалов ортофлавивирусов и роста туристических потоков особое значение приобретает специфическая серодиагностика инфекций, вызванных как близкородственными, так и филогенетически удалёнными вирусами. Для оценки специфичности разработанной ИФА-системы на основе рекомбинантных белков sE и dIII были исследованы сыворотки пациентов с диагнозами: японский энцефалит (ЯЭ), лихорадка Зика, лихорадка Западного Нила (ЛЗН), жёлтая лихорадка (ЖЛ), лихорадка денге, а также сыворотки с антителами к альфавирусу Чикунгунья (Таблица 7). Набор сывороток предоставил заведующий отделом вирусологии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) д.б.н. Игнатьев Г. М.

Таблица 7 – Исследование человеческих сывороток, содержащих антитела против других ортофлавивирусов в ИФА на основе белков sE и dIII

Номер набора	Диагноз	Количество сывороток, <i>n</i>	ИФА (sE) С+/n	ИФА (dIII) С+/n
1	ЯЭ *	1	1/1	1/1
	Лихорадка Зика	2	0/2	0/2
	ЛЗН	6	0/6	0/1
	Лихорадка денге	6	0/6	0/6
4	ЖЛ	5	0/5	0/5
	ЖЛ + Зика	1	0/1	0/1
	Чикунгунья + ЖЛ	5	0/5	0/5
	Чикунгунья + Зика	3	0/3	0/3
	Чикунгунья	3	0/3	0/3

* – Пациент был ранее иммунизирован вакциной против КЭ; С+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

Положительный результат в ИФА был получен только в одном случае — при исследовании сыворотки пациента с диагнозом ЯЭ. Анализ анамнеза показал, что данный пациент ранее был вакцинирован против КЭ и посещал эндемичные территории. Нами было установлено, что титр НАТ в сыворотке данного пациента против ВКЭ штамма MOS-152-N-2017 европейского подтипа составил 2,11 lg, а титр НАТ против ВЯЭ был – 2,8 lg. Таким образом, на панели сывороток людей, содержащих антитела к различным вирусам, показана высокая специфичность методики ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII.

Для оценки влияния вакцинации против ВЖЛ на выявление антител против ВКЭ исследовали сыворотки людей, вакцинированных и не вакцинированных против КЭ, до и после иммунизации вакциной против ВЖЛ (штамм 17D). Сыворотки предоставил заведующий отделом вирусологии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) д.б.н. Игнатьев Г. М.

В ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII антитела против ВКЭ стабильно выявлялись у всех вакцинированных против ВКЭ реципиентов независимо от вакцинации против ВЖЛ, тогда как у не вакцинированных против ВКЭ лиц результаты были отрицательными. Белок dI+II при исследовании сывороток вакцинированных обладал низкой чувствительностью (Таблица 8). Влияния вакцинации против ВЖЛ на специфичность выявления антител к ВКЭ при использовании рекомбинантных белков sE и dIII не было обнаружено.

Таблица 8 – Исследование сывороток людей, иммунизированных и неиммунизированных вакциной КЭ на фоне дополнительной иммунизации вакциной против ВЖЛ в ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dIII и dI+II

Группа	Вакцинация против ВКЭ	Вакцинация против ВЖЛ	Количество образцов	ИФА (sE) C+/n	ИФА (dI+II) C+/n	ИФА (dIII) C+/n
Группа 1 до вакцинации от ВЖЛ	+	–	8	8/8	5/8	8/8
Группа 2 до вакцинации от ВЖЛ	–	–	6	0/6	0/6	0/6
Группа 1 после вакцинации от ВЖЛ	+	+	8	8/8	5/8	8/8
Группа 2 после вакцинации от ВЖЛ	–	+	6	0/6	0/6	0/6

C+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

Для оценки специфичности разработанной методики ИФА исследовали сыворотки условно здоровых жителей Московской области, положительные на IgG антитела к ВКЭ в коммерческом ИФА и в РН как к ВКЭ, так и к ВЗН, при этом НАТ к ВЗН были выше, чем к ВКЭ в 9/10 образцах. При использовании ИФА на основе рекомбинантного белка sE антитела к ВКЭ выявлялись только в одном образце, для которого титр НАТ к ВКЭ превышал титр к ВЗН. Остальные сыворотки были отрицательны при исследовании с белками sE, dI+II и dIII. Результаты показывают высокую специфичность разработанной методики ИФА и перспективность использования белка sE для диагностики ВКЭ в регионах совместной циркуляции ВКЭ и ВЗН. Сыворотки предоставил научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» к.б.н. Холодилов И. С.

1.6 Сравнение разработанной методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков с коммерческими тест-системами на основе инактивированных вирионов ВКЭ

Эффективность разработанной ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков sE и dIII оценивали в сравнении с коммерческими наборами «Вектор-Бест» (Россия) и «Euroimmun» (Германия), применяемых для рутинной диагностики КЭ в Европе и России. Для анализа использовали сыворотки пациентов с клинически подтвержденными ортофлавивирусными инфекциями, включая КЭ, ЯЭ, ЛЗН, лихорадку Зика и лихорадку денге. Количественную оценку титров антител в разработанной системе проводили с использованием калибровочной кривой, построенной по разведению контрольной сыворотки вакцинированного против КЭ человека (Рисунок 11).

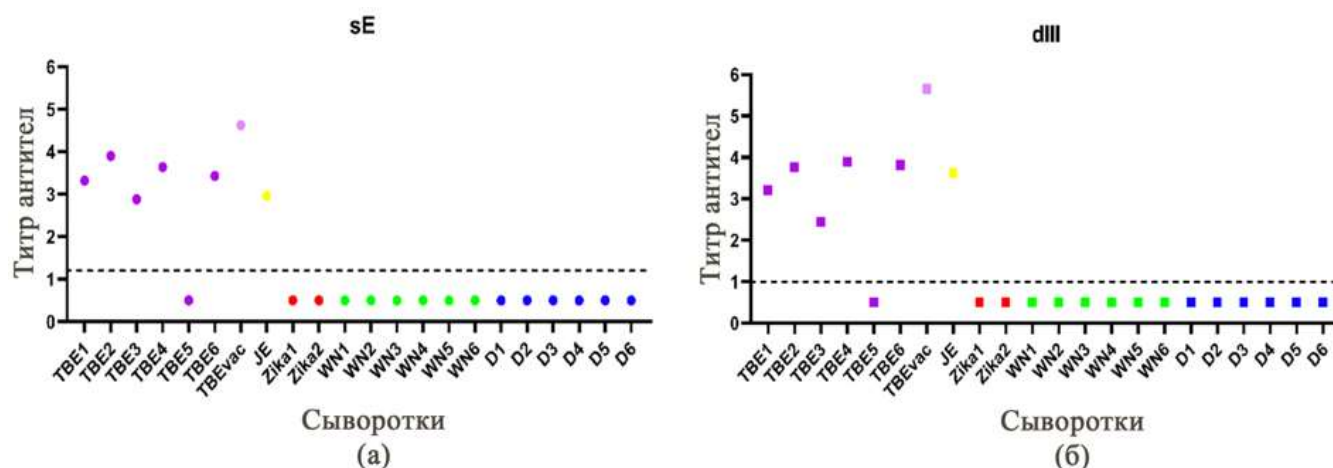


Рисунок 11 – Титры антител в исследуемых сыворотках, определенные с помощью ИФА с использованием в качестве антигена (а) белка sE и (б) белка dIII. Цветами указаны титры сывороток пациентов с диагнозами: фиолетовый – КЭ, светло-фиолетовый – условно здоровый реципиент иммунизированный вакцинированный против КЭ, желтый – ЯЭ, красный – лихорадка Зика, зеленый – ЛЗН, синий – лихорадка денге

Рекомбинантные белки sE и dIII продемонстрировали сопоставимые результаты: эффективность выявления антител против ВКЭ составила 80%, специфичность — 92%. Для набора «Euroimmun» эффективность составила 80% при специфичности 67%. Для набора «Вектор-Бест» — 100% и 67% соответственно (Таблица 9).

Таблица 9 – Исследование человеческих сывороток, содержащих АТ к различным ортофлавирусам в коммерческих наборах ИФА и некоммерческой ИФА тест-системе на основе рекомбинантных белков sE и dIII

Диагноз	ИФА (sE и dIII) С+/n	Euroimmune С+/n	Вектор-Бест С+/n
ЯЭ *	1/1	1/1	1/1
КЭ	4/5	4/5	5/5
Лихорадка Зика	0/1	0/1	0/1
Лихорадка денге	0/5	2/5	2/5
ЛЗН	0/5	1/5	1/5

* – Пациент был ранее иммунизирован вакциной против КЭ; С+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

Применение рекомбинантных белков позволяет повысить специфичность ИФА по сравнению с тест-системами на основе цельновирионного антигена без выраженного снижения чувствительности. Наиболее перспективным антигеном оказался белок sE, обеспечивавший высокую эффективность выявления анти-ВКЭ-антител. Использование отдельных доменов dIII и dI+II сопровождалось снижением диагностической чувствительности. Результаты исследования показывают перспективность использования рекомбинантных белков штамма Сухар ВКЭ в качестве основы для создания более специфичных тест-систем ИФА для серодиагностики КЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация посвящена препаративному получению рекомбинантных белков dI+II, dIII, sE ВКЭ штамма Сухар и sE штамма Софьин в бактериальной системе экспрессии *E. coli* и оценке их диагностического потенциала в ИФА для выявления антител к ВКЭ. Изучена чувствительность и специфичность диагностической методики ИФА, проведено сравнение с существующими ИФА тест-системами на основе цельновирионного антигена ВКЭ.

Для получения рекомбинантных белков был выбран ранее неисследованный штамм Сухар, относящийся к сибирскому подтипу ВКЭ и в дополнение sE штамм Софьин, принадлежащий к дальневосточному подтипу. В качестве антигенов для лабораторной ИФА тест-системы были отобраны: слитый домен dI+II, так как в нем находится большая часть общих внутривидовых эпитопов; домен dIII, в связи с тем, что он несет в себе большинство вирусоспецифических эпитопов; домен sE, как целый поверхностный вирусный антиген.

Для получения рекомбинантных белков подбирали и оптимизировали условия их выделения в бактериальной системе экспрессии. На первом этапе, используя стандартный режим культивирования бактерий (18 часов при 37°C), была подобрана оптимальная питательная среда для культивирования. Наибольшую экспрессию рекомбинантного белка sE штамма Сухар наблюдали при использовании среды ТВ.

Поскольку исследуемые рекомбинантные белки синтезировались в виде телец включения, на следующем этапе работы проводили подбор концентрации мочевины для буфера солиubilизации. Далее были подобраны оптимальные условия по выделению белков при помощи аффинной хроматографии (последовательные смывы белка с колонки при повышении концентрации имидазола) и обессоливания на колонках. Концентрация выделенных и очищенных рекомбинантных белков варьировалась от 3,1 до 7,8 мг с литра культуры. При постановке иммуноблота и ИФА было показано, что полученные белки сохранили способность связываться с антителами к ВКЭ.

Для изучения эффективности и специфичности диагностической методики ИФА на основе полученных белков в работе были использованы сыворотки мышей, кроликов и людей, содержащие антитела к ВКЭ и другим ортофлавивирусам. Все исследуемые мышинные и кроличьи сыворотки, полученные против штаммов ВКЭ, принадлежащих к различным подтипам, были положительны в ИФА с белками sE и dIII. Суммарно было протестировано 20 сывороток мышей и кроликов, предварительно иммунизированных ВКЭ и ортофлавивирусами ВПОВ, ВОГЛ, вирусом Лангат и ВЗН. Во всех сыворотках, содержащих антитела к широкому спектру штаммов ВКЭ, были выявлены анти-ВКЭ антитела (16/16). В сыворотках, содержащих антитела к другим ортофлавивирусам, не было выявлено ложноположительных результатов (0/4) при тестировании белков sE и dIII. При тестировании сывороток лабораторных животных рекомбинантный белок dI+II не сработал ни с одной мышиной или кроличьей сывороткой. Также были протестированы сыворотки мышей, взятые на разные сроки при экспериментальной инфекции ВКЭ. Сыворотки, взятые на ранней стадии инфекции, были протестированы на наличие не только IgG, но и IgM антител. При отсутствии IgG антител в тест-системе безошибочно выявлялись анти-ВКЭ-IgM антитела, что соответствует ранней стадии инфекции. Стоит отметить, что эффективность выявления анти-ВКЭ IgG антител с помощью рекомбинантного белка sE была выше, чем при использовании белка dIII, особенно при анализе сывороток вакцинированных животных.

Чувствительность выявления антител к ВКЭ зависела от объекта исследования. В сыворотках мышей антитела выявлялись в ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII даже при низких титрах НАТ, тогда как в сыворотках людей и обезьян антитела в ИФА выявлялись при титрах НАТ выше 2lg. Поскольку в РН детектируются только нейтрализующие антитела, а ИФА выявляет общий пул IgG антител к вирусу, наблюдаемые различия, по-видимому, обусловлены неодинаковым соотношением общих и нейтрализующих антител в исследуемых образцах.

Суммарно было протестировано 53 сыворотки крови от пациентов с подтверждённым диагнозом КЭ. В лабораторном варианте ИФА на основе рекомбинантного белка sE эффективность выявления антител к ВКЭ составила 98% (52/53). При использовании рекомбинантного белка dIII эффективность выявления антител была ниже – 66% (35/53). При тестировании белка dI+II данный показатель был минимальным и составил 42% (3/7). Таким образом, белок sE продемонстрировал лучший результат при его использовании в качестве антигена для постановки диагностического ИФА при выявлении антител к ВКЭ в сыворотках крови людей, не теряя при этом в специфичности.

Известно, что нейтрализующие эпитопы присутствуют во всех доменах белка Е ВКЭ. Однако большинство видоспецифичных эпитопов расположены в домене dIII, в то время как домены dI+II более консервативны и, следовательно, содержат больше перекрестно-реактивных эпитопов. Ранее было показано, что в иммунных сыворотках людей с острой формой КЭ, присутствуют антитела к dI+II. В исследованиях было показано, что при экспериментальной инфекции на мышинной модели значительная часть антител, образующихся при заражении ВКЭ, направлена против домена III белка Е. В нашем исследовании рекомбинантный белок dI+II не прореагировал с антителами ни одной из иммунных к ВКЭ мышинных или кроличьих сывороток. Однако при использовании материала от обезьян *Macaca fascicularis*, которые являются более близкой к человеку животной моделью, было продемонстрировано наличие антител к доменам dI+II после заражения ВКЭ или иммунизации вакциной КЭ. При этом анти-ВКЭ-антитела к рекомбинантным белкам dIII и sE в сыворотках, инфицированных ВКЭ обезьян и вакцинированных от КЭ животных, в последствии зараженных ВПОВ, выявлялись наравне с антителами к доменам dI+II. При исследовании человеческих сывороток рекомбинантный белок dI+II не всегда был информативен, поэтому использовался только при исследовании ограниченного набора сывороток. Полученные результаты указывают на некоторое сходство в спектре антител человека и макака. Наши результаты показывают, что sE захватывает больший спектр IgG антител, чем dIII или dI+II, при этом обладая сходной специфичностью. Однако при выявлении IgM-антител в сыворотках мышей на 7-й день после экспериментального заражения вирусом, белок dIII продемонстрировал более высокую эффективность по сравнению с sE. Данный факт обуславливает необходимость дополнительной оптимизации условий ИФА для детекции антител класса IgM. Таким образом, антитела к dI+II выявлялись в сыворотках обезьян и человека нерегулярно, их уровень не определялся в сыворотках мышей и кроликов, а использование белков sE и dIII позволяло выявить антитела к ВКЭ в разных организмах с высокой эффективностью.

Описанные ранее ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков были недостаточно проверены на специфичность относительно других ортофлавириусов. В данной работе были проведены исследования с использованием сывороток мышей и людей, содержащих антитела к различным ортофлавириусам: ВЗН, Лангат, ДЕНВ, ВПОВ, ВЖЛ, Зика, ВЯЭ, а также

альфавирусу Чикунгунья. Кроме того, были исследованы сыворотки людей со смешанными инфекциями, в которых не были выявлены анти-ВКЭ-антитела.

Повышение специфичности при разработке ИФА тест-систем чаще всего сопровождается сужением спектра выявляемых антител. В описанных результатах работы использовался широкий набор штаммов ВКЭ, относящихся к разным подтипам, таким как европейский, дальневосточный, сибирский, байкальский-1, байкальский-2. При исследовании ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков dI+II, dIII, sE использовали сыворотки людей с диагнозом КЭ из разных регионов России, взятые на разные сроки инфекции, а также использовали пул сывороток из ретроспективных анализов.

ИФА тест-система на основе белка sE ВКЭ штамма Сухар показала самую высокую эффективность выявления антител против ВКЭ при тестировании сывороток мышей, кроликов, обезьян и людей, при этом не проявляя неспецифичного связывания с антителами к другим ортофлавивирусам.

ВЫВОДЫ

1. Получены рекомбинантные белки (sE, dI+II, dIII) штамма Сухар сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита. Подобраны оптимальные условия для экспрессии соответствующих генов, солюбилизации, выделения и рефолдинга белков. Разработана диагностическая методика иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита на основе полученных рекомбинантных белков.

2. Диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE и dIII вируса клещевого энцефалита штамма Сухар обладает высокой чувствительностью: выявляет антитела в сыворотках лабораторных животных к 17 штаммам, относящимся к 5 подтипам вируса клещевого энцефалита, изолированным в разное время из разных источников и регионов. При анализе человеческих сывороток диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе белка sE обладает более высокой чувствительностью в сравнении с белками dI+II и dIII.

3. Доказана способность разработанной диагностической методики иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков sE и dIII дифференцировать антитела к вирусу клещевого энцефалита при анализе иммунных сывороток животных, содержащих антитела к вирусу клещевого энцефалита, вирусу Западного Нила, вирусу Лангат, вирусу Повассан, вирусу японского энцефалита, а также в сыворотках крови пациентов с диагнозами клещевой энцефалит, японский энцефалит, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, лихорадка денге и реципиентов, вакцинированных против вируса клещевого энцефалита и вируса желтой лихорадки.

4. Выявление антител к домену dI+II, в котором представлена большая часть кросс-реактивных эпитопов, связанных с антителозависимым усилением инфекции ортофлавивирусов, информативно при анализе сывороток людей и обезьян, но не может быть использовано при анализе сывороток лабораторных животных (кроликов и мышей).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для практического применения разработанной методики ИФА на основе рекомбинантных доменов важно обеспечить стабильное получение антигенов с высоким выходом и необходимой степенью чистоты, поскольку эти параметры определяют воспроизводимость и диагностическую

ценность метода. Надежность анализа поддерживается системой внутреннего и внешнего контроля качества, позволяющей своевременно выявлять возможные отклонения, связанные с реагентами и условиями проведения исследования. Разработанная тест-система может применяться для дифференциальной диагностики антител к ВКЭ и другим ортофлавивирусам, обеспечивая точность и возможность эффективного использования в клинической практике.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для доведения разработанной диагностической методики ИФА до коммерческого продукта, необходим подбор условий для длительного хранения и стабилизации белков.

Требуются дополнительные исследования для выбора рекомбинантного антигена для выявления антител класса IgM. В дальнейшем возможно улучшение разработанной ИФА тест-системы за счёт анализа специфических сайтов связывания антител против ВКЭ с антигенными сайтами в рекомбинантных доменах. Требуются дополнительные исследования по специфичности диагностической методики ИФА с сыворотками лабораторных животных или пациентов, в которых содержатся антитела к ортофлавивирусам шотландского энцефалита овец и Усугу.

Аналогичным образом изучение связывания перекрёстных сайтов в рекомбинантных доменах со специфическими для рода антителами в дальнейшем может позволить получить пан-ортофлавивирусную ИФА тест-систему для первичного анализа сывороток людей при сезонных заболеваниях невыясненной этиологии.

Также, с научно-фундаментальной точки зрения, перспективным направлением будет анализ состава антител в сыворотках крови людей и животных при иммунном ответе на инфекцию, для изучения патогенеза при КЭ. Также, направление по изучению спектра противовирусных антител в постинфекционный и поствакцинальный периоды для обеспечения эффективности и снижения риска антителозависимого усиления инфекции при использовании экстренных и профилактических препаратов против ВКЭ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **В.С. Барышникова**, Ю.В. Турченко, А.А. Шишова, А.С. Климентов, К.К. Тучинская, Г.Г. Карганова / Рекомбинантный гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы // Биотехнология – 2022. – Т. 38. – № 6. – С. 73-83. DOI: 10.56304/S0234275822060023 (Scopus, RSCI, K1). 0,688/0,115 п.л.
2. **V. Baryshnikova**, Y. Turchenko, K. Tuchynskaya, I. Belyaletdinova, A. Butenko, A. Dereventsova, G. Ignatiev, I. Kholodilov, V. Larichev, E. Lyapeykova, A. Rogova, A. Shakaryan, A. Shishova, A. Gmyl, G. Karganova / Recombinant TBEV Protein E of the Siberian Subtype Is a Candidate Antigen in the ELISA Test System for Differential Diagnosis // Diagnostics. – 2023. – Vol. 13. – № 20. – P. 3277. DOI: 10.3390/diagnostics13203277 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2). 1,000/0,067 п.л.
3. V. Illarionova, A. Rogova, K. Tuchynskaya, V. Volok, Y. Rogova, **V. Baryshnikova**, Y. Turchenko, A. Litov, A. Kalyanova, A. Siniugina, A. Ishmukhametov, G. Karganova / Inapparent Tick-Borne Orthoflavivirus Infection in *Macaca fascicularis*: A Model for Antiviral Drug and Vaccine Research // Vaccines. – 2023. – Vol. 11. – № 12. – P. 1754. DOI: 10.3390/vaccines11121754 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q1). 2,000/0,167 п.л.