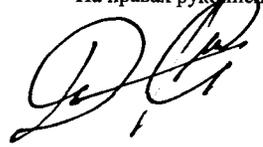


На правах рукописи



**Дьяррассуба Абдулайе**

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ГЕПАТИТА Е**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

21 СЕН 2016



Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН

доктор медицинских наук, профессор **Михайлов Михаил Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Быстрова Татьяна Николаевна**

доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»

**Алаторцева Галина Ивановна**

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ «Институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

**Ведущая организация**

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Защита диссертации состоится «19» октября 2016 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при ФГАОУ ВО "Российском университете дружбы народов" по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6) и на сайте [www.rudn.ru](http://www.rudn.ru).

Автореферат размещен на сайте [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru)

Автореферат разослан «09» сентября 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.39 ,  
кандидат биологических наук, доцент



О.Б. Гигани

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы

Гепатит Е (ГЕ) является инфекционным заболеванием, вызываемым небольшим безоболочечным РНК-содержащим вирусом, принадлежащим к роду *Hepevirus* семейства *Hepeviridae*. ГЕ — одна из наиболее серьезных и актуальных проблем здравоохранения в развивающихся, а также во многих развитых странах. По оценкам ВОЗ, в развивающихся странах ежегодно фиксируется более 3 миллионов симптоматических случаев ГЕ и 70 000 смертей, вызванных этой инфекцией.

Вирус гепатита Е (ВГЕ) широко распространен в странах тропического пояса, где по сути занимает экологическую нишу вируса гепатита А, вызывая вспышки и спорадические случаи заболевания преимущественно среди молодых взрослых. Накопление сведений о циркуляции вируса гепатита Е (ВГЕ) и случаях ассоциированного с ним заболевания на территориях, ранее считавшихся эндемичными (страны умеренного климата, в том числе Россия), сделало актуальным надзор за данной инфекцией и включение маркеров ГЕ в систему дифференциальной лабораторной диагностики гепатитов. С 2013 года ГЕ является официально регистрируемой в России нозологической формой. Основными маркерами ГЕ, применяемыми для его лабораторной диагностики, являются антитела к ВГЕ (анти-ВГЕ) классов IgM и IgG, а также вирусная РНК, выявляемая в образцах стула и/или сыворотки крови у инфицированных лиц. Как правило, период виремии при ГЕ (то есть присутствие РНК ВГЕ в крови) составляет не более двух недель на начальных этапах инфекции. Выделение вируса с фекалиями, и, соответственно, обнаружение РНК ВГЕ в стуле, происходит, как правило, на протяжении всей инфекции. Выявление анти-ВГЕ IgM свидетельствует об острой или недавно перенесенной ВГЕ-инфекции, тогда как присутствие анти-ВГЕ IgG без антител класса М указывает на перенесенную ранее

инфекцию. Считается, что анамнестические анти-ВГЕ IgG сохраняются на протяжении многих лет и обеспечивают пожизненный иммунитет против повторного инфицирования.

Выявление анти-ВГЕ и РНК ВГЕ важно не только для адекватной диагностики ГЕ, но и для эпидемиологического надзора за инфекцией. Анти-ВГЕ IgG определяют в сероэпидемиологических исследованиях для оценки широты прослойки лиц, встречавшихся с данным возбудителем. Выявление РНК ВГЕ у заболевших и последующий анализ генетического материала вируса необходимы для установления источников инфекции и возможных путей передачи ВГЕ. Однако проведенный ранее анализ чувствительности и специфичности разных тестов на анти-ВГЕ методом иммуноферментного анализа (ИФА) показал существование значительных различий между диагностикумами. Именно эти различия, как считается, являются причиной противоречивых результатов сероэпидемиологических исследований, выполненных на одних и тех же территориях. Аналогичным образом различаются и молекулярные тесты для выявления РНК ВГЕ. Очевидно, именно отсутствие национальных стандартов диагностики ГЕ является причиной противоречивого характера сведений об эпидемиологии ГЕ на разных территориях.

Разработка надежной системы диагностики ВГЕ-инфекции является важной задачей в РФ и других странах, как для теоретической вирусологии, поскольку расширяет современные представления о распространенности ВГЕ-инфекции, так и для практического здравоохранения: это помогает обнаружить группы риска и потенциальные источники инфицирования. Стандартизованный диагностический инструментарий является ключевым моментом для получения ответов на следующие нерешенные вопросы: продолжительность сохранения и динамика концентрации анти-ВГЕ у пациентов с реконвалесценцией; обеспечивает ли долгое сохранение антител IgG иммунную защиту организма от повторного инфицирования ВГЕ и какова протективная концентрация анти-ВГЕ? Для стандартизации

диагностики ГЕ Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) были выпущены два референсных материала – Стандарт анти-ВГЕ, разработанный Национальным институтом биологических стандартов и контролей (NIBSC) и Стандарт РНК ВГЕ, разработанный Институтом Пауля Эрлиха. Тем не менее, применяемые в настоящее время в России и за рубежом серологические и молекулярные тесты, как правило, не валидированы относительно единого стандарта.

Вышеизложенное определяет актуальность темы диссертации.

### **Цель исследования**

Целью диссертационного исследования является создание подходов к стандартизации системы лабораторной диагностики гепатита Е.

### **Задачи исследования**

1. С помощью стандартов ВОЗ определить чувствительность тестов, применяемых в РФ для серологической и молекулярной диагностики ГЕ.
2. Разработать национальный стандарт выявления анти-ВГЕ и провести его валидацию относительно международного стандарта ВОЗ.
3. Определить распределение концентраций анти-ВГЕ IgG у серопозитивных лиц и установить долгосрочную динамику изменения этого показателя у реконвалесцентов.
4. Оценить диагностическую значимость определения индекса авидности анти-ВГЕ у серопозитивных лиц.

### **Научная новизна работы**

Впервые получен национальный количественный стандарт анти-ВГЕ, валидированный относительно стандарта ВОЗ. Впервые на представительной выборке клинических образцов установлены различия в концентрации анти-ВГЕ и их авидности в зависимости от стадии инфекции (острый гепатит Е, ранние реконвалесценты, давно перенесенная инфекция). С помощью

Первого Международного стандарта Всемирной организации здравоохранения для РНК вируса гепатита Е определена аналитическая чувствительность тест-системы для выявления РНК ВГЕ и установлена четкая зависимость чувствительности детекции от объема анализируемого образца.

### **Теоретическая и практическая значимость и внедрение результатов**

В результате проведенных исследований получены инструменты для стандартизации лабораторной диагностики гепатита Е и эпидемиологического надзора за данной инфекцией – молекулярный тест для выявления РНК ВГЕ с чувствительностью в диапазоне 125-250 МЕ/мл, данные по аналитической чувствительности коммерческого ИФА-теста для выявления анти-ВГЕ, и отечественный стандарт анти-ВГЕ с концентрацией 5 МЕ/мл. Установлены величины концентраций анти-ВГЕ и показатели авидности антител у пациентов в зависимости от стадии инфекции (острый гепатит, ранние реконвалесценты, давно перенесенная инфекция). Полученные результаты продемонстрировали, что тест на авидность позволяет более чем в 80% случаев дифференцировать давно перенесенную ВГЕ-инфекцию от случаев ранней реконвалесценции.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В основе выполненного исследования лежит количественное и полуколичественное определение анализируемых маркеров (анти-ВГЕ IgG, РНК ВГЕ) относительно стандартного референсного материала (Международные стандарты ВОЗ для анти-ВГЕ и РНК ВГЕ, соответственно). Для этого были использованы серологические и молекулярно-биологические методы детекции. Полученные результаты подвергнуты статистическому анализу с использованием стандартных статистических методик.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Аналитическая чувствительность испытанных отечественных серологических и молекулярных тестов для диагностики гепатита Е,

определенная относительно референсных материалов ВОЗ и выраженная в Международных Единицах, равна или превышает соответствующие показатели зарубежных аналогов.

2. Разработан национальный референсный материал для антител к вирусу гепатита Е, позволяющий проводить оценку аналитической чувствительности диагностических тестов и выражения полученных в них результатов в Международных Единицах.

3. Определены средние величины и разброс значений концентрации анти-ВГЕ в клинических образцах. Установлено, что среди лиц, недавно встречавшихся с ВГЕ, концентрация анти-ВГЕ в два раза выше по сравнению с теми, кто давно перенес инфекцию.

4. Продемонстрирована диагностическая значимость определения avidности анти-ВГЕ класса IgG при тестировании образцов сыворотки крови от пациентов с разными стадиями ВГЕ-инфекции (острый гепатит Е, ранние реконвалесценты, давно перенесенная инфекция).

Степень достоверности работы определяется представительностью и достоверностью анализируемых выборок, проведением экспериментальной части работы на сертифицированном оборудовании с применением системы внешних и внутренних контролей, использованием валидированного референсного материала; полученные данные согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. В работе использованы современные методики сбора и обработки информации, полученные данные основаны на применении обоснованных представительных выборочных совокупностей.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции молодых ученых Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (апрель 2013 г., г. Москва).

#### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 4 статьи - в рецензируемых журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 96 страницах текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 14 отечественных и 206 зарубежных источников. Диссертационная работа иллюстрирована 8 таблицами и 13 рисунками.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Материалы и методы**

Для проведения исследований были использованы следующие референсные материалы:

1. 1-ый Международный Стандарт ВОЗ для РНК вируса гепатита Е (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays). PEI code 6329/102. Лиофилизированный, концентрация РНК ВГЕ  $2,5 \times 10^6$  МЕ/мл.

2. Стандарт (референсный реагент) ВОЗ для антител к вирусу гепатита Е (WHO Reference Reagent WHO REFERENCE REAGENT FOR HEPATITIS E VIRUS ANTIBODY, human serum NIBSC code: 95/584), лиофилизированный, концентрация анти-ВГЕ 100 единиц/мл.

Основным материалом исследования являлись образцы сыворотки крови людей, собранные в 2009-2014 гг. на территории Российской Федерации. В исследование были включены 97 образцов, полученных от условно здоровых лиц, а также пациентов с лабораторно подтвержденным ГЕ из Белгородской, Владимирской, Свердловской и Московской областей,

Хабаровского края. Собранные образцы хранились в аликвотах по 500 мкл при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Характеристика образцов приведена в Таблице 1.

Таблица 1. Клинические образцы, включенные в исследование.

Группа	Область	N	Когорта	Серологическая характеристика	Всего, N
1	Свердловская область	16	Первичные доноры	Анти-ВГЕ IgG+/IgM-	51
	Московская область	34	Первичные доноры		
	Хабаровский край	1	Первичные доноры		
2	Владимирская область	8	Острый гепатит E	Анти-ВГЕ IgG+/IgM+	46
	Белгородская область	1	Острый гепатит E		
	Белгородская область	26	Первичные доноры		
	Свердловская область	2	Первичные доноры		
	Хабаровский край	5	Первичные доноры		
	Московская область	4	Первичные доноры		

Для оценки чувствительности выявления РНК ВГЕ разных генотипов были подготовлены 3 панели вирусных геноизолятов ВГЕ с известным генотипом, установленным на основании анализа нуклеотидной последовательности фрагмента открытой рамки считывания 2 (ORC2) вирусного генома. Все геноизоляты были получены из рабочей коллекции лаборатории этиологии, диагностики, эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», нуклеотидные последовательности ORC2 каждого изолята ВГЕ депонированы в базе данных GenBank. Всего было проанализировано 20 геноизолятов ВГЕ, выделенных от человека, 30 геноизолятов, выделенных от домашних свиней, и 16 геноизолятов,

выделенных от кроликов. Характеристики геноизолятов ВГЕ, включенных в исследование, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Геноизоляты ВГЕ, включенные в исследование

Генотип ВГЕ	Организм	Тип образца	Число геноизолятов	Номера в базе данных GenBank
1	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	Фекалии	7	-
3	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	Сыворотка крови	12	JX912475 - JX912477 KP174806 JN204462 JN204463 KP174807 - KP174809 JN204464 - JN204467 JX912477
3	Свинья домашняя ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Фекалии	30	HQ399156 - HQ399185
4	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	Сыворотка крови	1	JX912477
3 (Rabbit HEV)	Кролик ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Фекалии	16	KP144111 - KP144126

### Определение чувствительности выявления РНК ВГЕ

Исходная концентрация Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ составляла 250000 МЕ/мл. Готовили серию разведений стандарта в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с шагом 1 lg МЕ/мл в диапазоне концентраций, меняя наконечник дозатора на каждом разведении. В результате была получена серия разведений в диапазоне концентраций от 250000 МЕ/мл до 0,25 МЕ/мл. Для получения большего количества точек разведений в диапазоне 250-25 МЕ/мл, аналогичным образом готовили

дополнительную серию разведений стандарта в стерильном фосфатно-солевом буфере с концентрациями 125 МЕ/мл, 62,5 МЕ/мл и 31,25 МЕ/мл.

Для каждого разведения стандарта РНК ВГЕ проводили параллельно выделение нуклеиновых кислот двумя способами – из 50 мкл образца с помощью набора для выделения ДНК/РНК из сыворотки/плазмы крови (производство НПО «Литех») и из 400 мкл образца с помощью набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I для применения в автоматизированной системе для выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact System (производство Roche Diagnostics Ltd.). Выделение нуклеиновых кислот проводили в соответствии с протоколом производителя соответствующих наборов. В каждом выделении в качестве отрицательного контроля использовали ФСБ, которым разводили стандарт. Для каждого разведения определяли РНК ВГЕ в трех повторах методом обратной транскрипции – гнездовой ПЦР (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС2), кодирующей капсидный белок ВГЕ (Таблица 3).

Таблица 3. Олигонуклеотиды, применявшиеся для амплификации РНК ВГЕ

Последовательности	Положение	Направление	Позиция в геноме ВГЕ*
5' – aay tat gcm cag taccgggtt g -3'	Внешний	Прямой	5687 -5708
5' – ccc ttatcctgctgagcattctc -3'	Внешний	Обратный	6395 -6414
5' – gtyatgytytgcata cat ggc t -3'	Внутренний	Прямой	5972 -5993
5' – agc cga cga aat yaa ttc tgt c -3'	Внутренний	Обратный	6298 -6319

\* нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму ВГЕ Burma (номер в базе данных GenBank M73218)

Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42 °С – 1 час, затем 5 мин. – 94 °С (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94 °С – 30 сек, 45 °С – 30 сек., 72 °С – 45 сек., финальная элонгация – 72 °С – 7 мин. Условия для

второго раунда ПЦР – 35 циклов: 94 °С – 30 сек, 45 °С – 30 сек., 72 °С – 45 сек., финальная элонгация – 72 °С – 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.

#### **Определение чувствительности теста для выявления анти-ВГЕ IgG**

Лиофилизированный стандарт ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) восстанавливали стерильной водой до концентрации 100 единиц в миллилитре (МЕ/мл) в соответствии с инструкцией производителя. Из восстановленного стандарта готовили в стерильной воде серию разведений в диапазоне концентраций от 10 МЕ/мл до 0,001 МЕ/мл. Полученные разведения тестировали на анти-ВГЕ IgG методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G») согласно инструкции производителя. Каждое разведение тестировали в трех повторях.

#### **Разработка вторичного стандарта анти-ВГЕ**

Для приготовления вторичного стандарта анти-ВГЕ был выбран образец донорской плазмы, положительный по анти-ВГЕ IgG в тесте ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G с высоким значением ОП (более 2,5). Образец был нереактивным в лицензированных тестах на антитела к ВГС, антитела к ВИЧ, HBsAg, антитела к HBc; негативным по РНК ВИЧ, РНК ВГС, ДНК ВГВ. Содержимое мешка с донорской плазмой центрифугировали в течение 1 часа при 4 000 об./мин., отбирали супернатант и делали 500 аликвоты объемом 0,5 мл. Из трех аликвот готовили три идентичных серии разведений в стерильной воде: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Каждую серию разведений независимо тестировали на анти-ВГЕ IgG с использованием набора реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G») согласно инструкции производителя. В каждой постановке ИФА в качестве количественного стандарта использовали разведения стандарта ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) в концентрациях 0,25 МЕ/мл, 0,5 МЕ/мл, 1 МЕ/мл, 5 МЕ/мл и 10 МЕ/мл. На основании полученной калибровочной

кривой в каждом разведении тестируемой серии определяли концентрацию анти-ВГЕ в МЕ/мл. Остальные аликвоты лиофилизировали. Три лиофилизированных образца восстанавливали стерильной водой до объема 0,5 мл и готовили из них три идентичных серии разведений в стерильной воде: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Каждую серию разведений независимо тестировали на анти-ВГЕ IgG, аналогично образцам до лиофилизации с использованием набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и рассчитывали концентрацию анти-ВГЕ в каждом образце относительно калибровочной кривой стандарта ВОЗ. Полученные значения концентрации анти-ВГЕ по каждому флакону вторичного стандарта до и после лиофилизации сравнивали попарно между собой и со значениями, полученными для стандарта ВОЗ.

### **Определение avidности антител к ВГЕ класса IgG**

Все клинические образцы, включенное в данное исследование, были проанализированы методом ИФА на наличие анти-ВГЕ классов IgM и IgG. Для измерения индекса avidности анти-ВГЕ IgG, образцы сыворотки крови были разделены на две группы: (1) образцы, позитивные по анти-ВГЕ IgG, и отрицательные по анти-ВГЕ IgM (n=51) (2) и образцы, положительные по анти-ВГЕ классов IgG и IgM (n=46). Для измерения avidности антител IgG использовали новый тест «DS-EIA-Anti-HEV-G-Avidity» (НПО «Диагностические системы») в соответствии с инструкцией производителя. Индекс avidности (AI) рассчитывали по формуле:

$$AI = \frac{OD_{\text{sample}}(\text{reaction with Dissociation solution})}{OD_{\text{sample}}(\text{reaction with Blank solution})} \times 100$$

Низкий индекс avidности образца (<20%) позволяет предполагать острую инфекцию или повторную встречу с ВГЕ. Высокий индекс avidности образца (>20%) позволяет предполагать, что встреча с вирусным агентом была давно.

## Статистические методы

Для статистической оценки достоверности полученных данных использовали точный тест Фишера (Fisher's exact test). Различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ( $p < 0,05$ ). Расчет величины стандартного отклонения (SD) и критерия Фишера проводили с помощью стандартного пакета Microsoft Excel. Для значений оптической плотности разведений стандарта ВОЗ, разведений вторичного стандарта до лиофилизации и его разведений после лиофилизации проводили корреляционный анализ, значения коэффициента корреляции ( $r^2$ ) при попарном сравнении серий разведений просчитывали с помощью стандартного пакета Microsoft Excel.

## Результаты и их обсуждение

### Определение чувствительности выявления РНК ВГЕ

Полученные результаты выявления РНК ВГЕ в серии разведений Первого Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Результаты выявления РНК ВГЕ в разведениях Первого Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ

№ п/п	Концентрация РНК ВГЕ, МЕ/мл	Результат выявления РНК ВГЕ в ОТ-ПЦР					
		Выделение из 50 мкл			Выделение из 400 мкл		
		Повторы			Повторы		
		1	2	3	1	2	3
1	250 000 МЕ/мл	+	+	+	+	+	+
2	25 000 МЕ/мл	+	+	+	+	+	+
3	2 500 МЕ/мл	+	+	+	+	+	+
4	250 МЕ/мл	+	+	+	+	+	+
5	125 МЕ/мл	-	-	-	+	+	+
6	62,5 МЕ/мл	-	-	-	-	-	-
7	31,25 МЕ/мл	-	-	-	-	-	-
8	25 МЕ/мл	-	-	-	-	-	-
9	2,5МЕ/мл	-	-	-	-	-	-
10	0,25 МЕ/мл	-	-	-	-	-	-

Для всех протестированных серий разведений Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ были получены идентичные результаты, противоречивых результатов детекции между повторами тестирования с соответствующим методом выделения отмечено не было. При выделении нуклеиновых кислот из образца объемом 50 мкл методом экстракции фенол-хлороформом, предельное разведение, давшее положительный результат, соответствовало концентрации РНК ВГЕ 250 МЕ/мл. При выделении из образца объемом 400 мкл с набором MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I, предельное разведение, давшее положительный результат при выявлении РНК ВГЕ, соответствовало концентрации 125 МЕ/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что именно этап пробоподготовки (выделения нуклеиновых кислот) и объем анализируемого образца играют ключевую роль для повышения чувствительности выявления РНК ВГЕ методом ОТ-ПЦР. Таким образом, по результатам тестирования серии разведений Международного стандарта ВОЗ, чувствительность испытуемой тест-системы составила не менее 250 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 50 мкл, и не менее 125 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 400 мкл. Полученные для данной тест-системы показатели чувствительности равны или превышают аналогичные показатели, описанные в литературе. Так, по данным A. Girón-Callejas с соавторами, чувствительность теста для выявления РНК ВГЕ, основанного на ПЦР в реальном времени с праймерами к участку перекрытия открытых рамок 2 и 3 генома ВГЕ, составляет 250 МЕ/мл при анализе образцов объемом 200 мкл (Girón-Callejas et al., 2015).

Международный стандарт ВОЗ, применявшийся нами для оценки чувствительности выявления вирусной РНК, содержит РНК ВГЕ генотипа 3 [1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays PEI code 6329/10 (Version 1.0, 7th July 2011)]. Для подтверждения универсальности данной тест-системы (возможности выявления РНК вируса гепатита Е различных

генотипов) были нами протестированы три панели клинических образцов, содержащих ВГЕ разных генотипов: панель №1 образцов фекальных экстрактов и сыворотки крови человека, содержащих ВГЕ трех генотипов – 1, 3 и 4; панель №2 образцов фекальных экстрактов, полученных от свиней, содержащих вирус гепатита Е генотипа 3; панель №3 образцов фекальных экстрактов, полученных от кроликов, содержащих вирус гепатита Е кроликов. Во всех образцах, содержащих ВГЕ генотипов 1, 3 и 4, а также кроличьи штаммы ВГЕ, была выявлена РНК ВГЕ, что свидетельствует об универсальности испытываемой тест – системы, независимо от генотипа вируса.

### **Определение чувствительности теста для выявления анти-ВГЕ IgG**

На рисунке 1 приведены результаты выявления анти-ВГЕ IgG в разведениях стандарта ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G». Положительный результат был получен для образцов с номинальной концентрацией 0,25 МЕ/мл и выше в трех протестированных сериях разведений стандарта ВОЗ. Для всех серий разведений Международного стандарта были получены идентичные результаты, противоречивых результатов детекции между повторами тестирования соответствующих образцов отмечено не было.

Величина стандартного отклонения (SD) при тестировании разведений стандарта ВОЗ находилась для всех протестированных концентраций в диапазоне от 0,002 до 0,076, что указывает на высокую степень воспроизводимости результатов при многократном тестировании. Результаты тестирования панели разведений стандарта ВОЗ для анти-ВГЕ продемонстрировали, что чувствительность выявления анти-ВГЕ IgG в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» оставляет 0,25 МЕ/мл. Этот показатель идентичен чувствительности теста, широко применяемого за рубежом (Wantai (PE2) HEV IgG EIA (Fortress Diagnostics, Antrim, Northern Ireland)) и в 10 раз выше другого теста (2,5 МЕ/мл для системы Genelabs (GL) HEV IgG EIA (Genelabs, Inc., Singapore)).

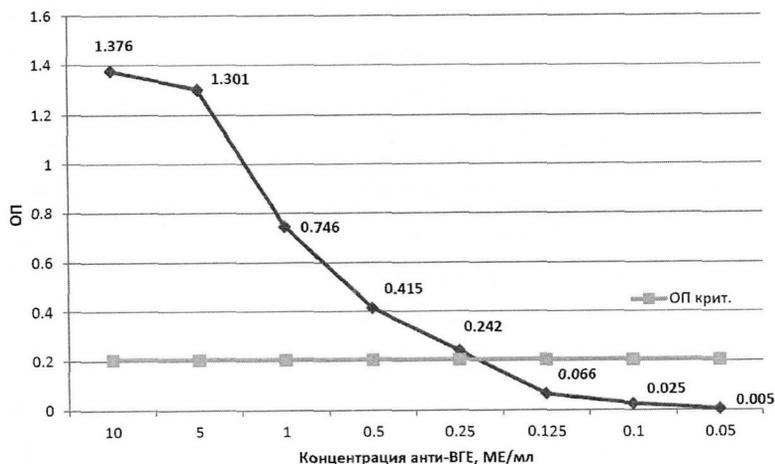


Рисунок 1. Результаты выявления анти-ВГЕ IgG в разведениях стандарта ВОЗ. Подписи значений на кривой соответствуют средним значениям оптической плотности; ОП крит. — величина отсекающей оптической плотности для набора реагентов, рассчитанная по протоколу производителя.

Таким образом, отечественная тест-система для выявления анти-ВГЕ, с помощью которой несколькими группами исследователей были получены данные по сероэпидемиологии ГЕ в России, обладает одним из наиболее высоких показателей аналитической чувствительности среди существующих в мире тестов.

### Определение диагностической значимости определения avidности антител к вирусу гепатита E класса IgG

Всего было проанализировано 97 образцов сыворотки крови пациентов для измерения avidности антител IgG к вирусу гепатита E. В первую группу из 51 образца сыворотки крови, содержащих анти-ВГЕ IgG, но не содержащих анти-ВГЕ IgM, были включены сыворотки крови от жителей Свердловской области, проходивших в начале 1980-х годов срочную воинскую службу в Афганистане (гиперэндемичном по ГЕ регионе), и имевших риск встречи с ВГЕ более 30 лет назад (n = 16). Также в эту группу образцов были включены сыворотки крови от условно здорового населения

Московской области (n=34) и Хабаровского края (n=1), в которых при проведении популяционных сероэпидемиологических исследований были выявлены анти-ВГЕ. Во вторую группу из 46 образцов сыворотки крови, положительных по анти-ВГЕ классов IgG и IgM, были включены 8 образцов от пациентов с острым ГЕ, заболевших в 2009 году во Владимирской области при вспышке данной инфекции, а также 1 образец от пациента с ГЕ из Белгородской области. Также в эту панель образцов были включены 26 сывороток от лиц с серологическими маркерами текущей или недавно перенесенной ВГЕ-инфекции, выявленными на территории Белгородской области. Результаты эпидемиологических исследований, проведенных недавно в данном регионе, продемонстрировали широкую циркуляцию ВГЕ на этой территории, и позволяют рассматривать Белгородскую область как территорию, эндемичную по ВГЕ-инфекции (Потёмкин И.А. с соавт., 2014).

Дополнительно в панель образцов были включены сыворотки крови от лиц, у которых при проведении сероэпидемиологических исследований были выявлены анти-ВГЕ IgG и IgM (4 образца из Московской области, 2 образца из Свердловской области, 5 образцов из Хабаровского края)

В первой панели образцов (анти-ВГЕ IgG+/IgM-) были выявлены 4 (7,8%) образцов с индексом авидности ниже 20%, что может указывать на недавнее инфицирование вирусом гепатита Е. Авидность была выше 40% в 43 (84,3%) образцах данной панели, что свидетельствует о давности инфицирования ВГЕ. В 4 (7,8%) случаях авидность антител IgG была промежуточная (между 20 и 40%) (Рисунок 2).

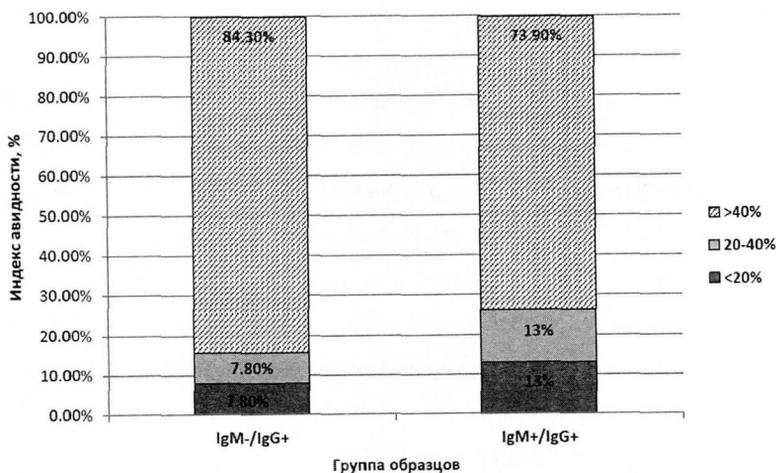


Рисунок 2. Распределение величин индекса avidности анти-ВГЕ IgG в двух группах образцов сыворотки крови: от лиц, давно перенесших инфекцию (анти-ВГЕ IgG+/IgM-) и больных ГЕ или недавних реконвалесцентов (анти-ВГЕ IgG+/IgM+).

Инструкцией производителя используемой нами тест-системы при интерпретации результатов не предусмотрено наличие такого промежуточного значения, и все случаи с индексом avidности выше 20% рекомендуется рассматривать как давно перенесенную инфекцию. Среднее значение avidности в образцах первой панели составило 65,6% с диапазоном значений от 10% до 100%. Во второй панели сывороток крови (анти-ВГЕ IgG+/IgM+) из 46 образцов в 6 (13%) показатели avidности составили менее 20%. У одного пациента avidность антител IgG к ВГЕ составляла 1%, этот образец был также положительным по РНК ВГЕ. Уровень avidности выше 40% был в 34 (73,9%) образцах, в 6 (13%) образцах avidность составила 20-40%. Среднее значение avidности в образцах второй панели составило 53,4%. В группе 2 среднее значение индекса avidности было ниже, чем в группе 1, на 12,2% ( $P < 0.05$ ). Образцы с индексом avidности до 20% и 20-40% в группе 2, т.е. среди лиц с предположительно недавно перенесенной ВГЕ-

инфекцией, встречались почти в 2 раза чаще по сравнению с группой 1, т.е. у лиц с давно перенесенной ВГЕ-инфекцией (13% против 7,8%;  $P < 0.05$ ).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что измерение avidности анти-ВГЕ класса IgG может быть использовано для диагностики ГЕ как дополнительный этап до постановки ПЦР. Учитывая, что виремия и выделение РНК ВГЕ с фекалиями наблюдается не у всех пациентов с острым ГЕ, а результаты определения анти-ВГЕ IgM могут быть ложноположительными, определение индекса avidности анти-ВГЕ IgG позволит получить дополнительную информацию для уточнения диагноза острого гепатита Е.

### **Разработка вторичного стандарта анти-ВГЕ**

Результаты определения анти-ВГЕ IgG в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации приведены на рисунке 3. Разведения до 1:16 включительно дали положительный результат, при этом значения ОП в разведениях, полученных для образцов до и после лиофилизации, не имели значимых отличий. Корреляционный анализ значений оптической плотности для разведений стандарта ВОЗ, разведений вторичного стандарта до лиофилизации и его разведений после лиофилизации показал высокую степень корреляции. Значения коэффициента корреляции ( $r^2$ ) при попарном сравнении серий разведений во всех случаях превышали 0,99.

На рисунке 3 приведены значения концентрации анти-ВГЕ в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации, выраженные в МЕ/мл. Для построения калибровочной кривой для расчета значений в МЕ/мл разведений вторичного стандарта были использованы значения ОП, полученные в той же постановке ИФА для Международного стандарта ВОЗ. Концентрация анти-ВГЕ в разработанном вторичном стандарте составила 5 МЕ/мл. Концентрация анти-ВГЕ, выраженная в МЕ/мл, снижалась в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации согласованно, и не отличалась от линейности снижения концентрации в разведениях Международного стандарта ВОЗ (Рисунок 4). Полученные результаты

свидетельствуют об отсутствии деградации анти-ВГЕ IgG в полученном вторичном стандарте в результате лиофилизации.



Рисунок 3. Значения оптической плотности при определении анти-ВГЕ IgG в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации.

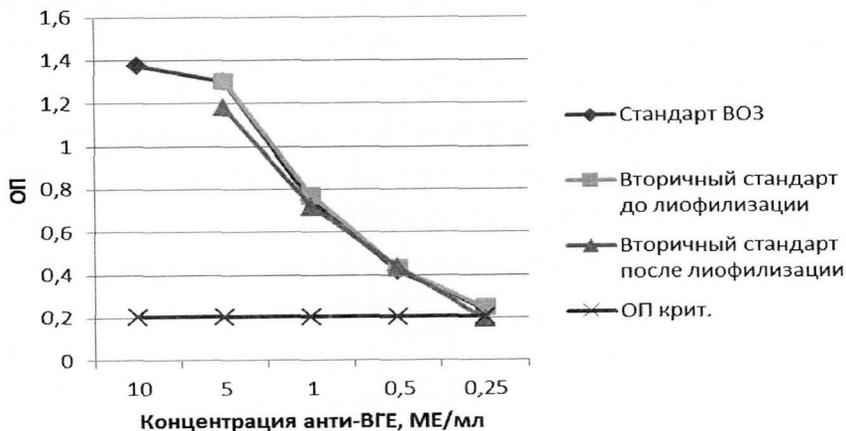


Рисунок 4. Концентрация анти-ВГЕ IgG во вторичном стандарте, рассчитанная в МЕ/мл относительно Международного стандарта ВОЗ.

Полученный вторичный стандарт представляет собой лиофилизированную донорскую плазму, негативную по маркерам ВИЧ-

инфекции, гепатитов В и С, и имеет концентрацию анти-ВГЕ, равную 5 МЕ/мл. Тестирование разведений данного стандарта показало линейность результатов определения анти-ВГЕ, совпадающую с линейностью результатов тестирования Международного стандарта ВОЗ, и отсутствие снижения концентрации анти-ВГЕ в результате лиофилизации. Таким образом, полученный вторичный стандарт анти-ВГЕ может применяться для оценки аналитической чувствительности выполняемых исследований и выражения полученных результатов в МЕ/мл.

### **Определение концентрации анти-ВГЕ IgG в клинических образцах с использованием вторичного стандарта анти-ВГЕ**

С помощью разработанного стандартного образца анти-ВГЕ IgG, валидированного относительно международного стандарта ВОЗ, нами была определена концентрация анти-ВГЕ в образцах лиц с давно перенесенной ВГЕ-инфекцией, а также у недавних реконвалесцентов и пациентов с ГЕ. Исследования проводили с помощью тех же двух панелей образцов, что использовались для оценки степени avidности анти-ВГЕ IgG. Оказалось, что среди лиц, позитивных по IgG и IgM (т.е. недавно встречавшихся с ВГЕ), концентрация анти-ВГЕ в два раза выше по сравнению с имеющими только IgG (12,5 МЕ/мл против 5,5) (Рисунок 5). Сходные значения были получены в Великобритании при обследовании сывороток доноров крови – средняя концентрация анти-HEV IgG составила 5.0 МЕ/мл (от 0.3 до 45.4) в образцах, отрицательных по анти-ВГЕ IgM и имеющих высокий индекс avidности (>50%) (Bendall R. et al., 2010).

Концентрации анти-ВГЕ IgG в образцах варьировали от 0,32 МЕ/мл до 158,4 МЕ/мл. Поскольку концентрация вторичного стандарта составляла 5 МЕ/мл, и эта величина определяла верхний предел линейного диапазона количественного определения анти-ВГЕ, высокотитражные образцы разводили и тестировали повторно, и затем полученный результат умножали на фактор разведения, чтобы получить значение концентрации анти-ВГЕ в исходном образце. Частота выявления образцов, в которых концентрация

анти-ВГЕ превышала 5 МЕ/мл и, соответственно, требовалось повторное тестирование после разведения, составила в группе образцов анти-ВГЕ IgG+/IgM- 18,2% (10/55) и в группе образцов анти-ВГЕ IgG+/IgM+ 15,2% (7/46), соответственно.

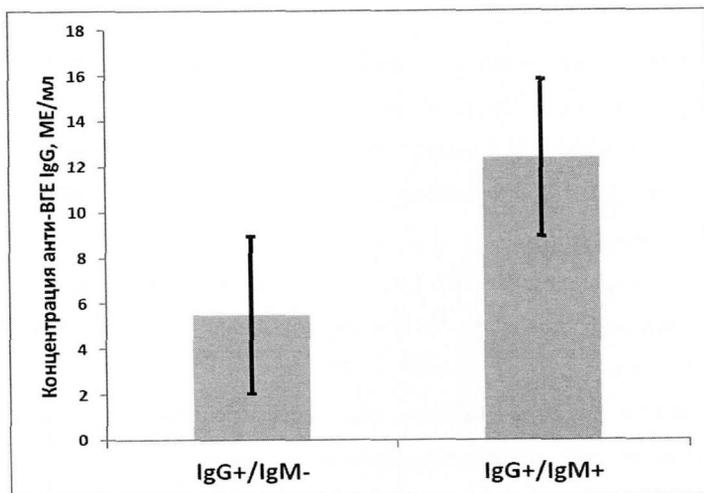


Рисунок 5. Средние концентрации анти-ВГЕ IgG в образцах сыворотки крови от лиц, давно перенесших инфекцию (анти-ВГЕ IgG+/IgM-) и больных ГЕ или недавних реконвалесцентов (анти-ВГЕ IgG+/IgM+). Планки погрешности соответствуют величине стандартной ошибки.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены инструменты для стандартизации лабораторной диагностики гепатита Е и эпидемиологического надзора за данной инфекцией – молекулярный тест для выявления РНК ВГЕ с чувствительностью в диапазоне 125-250 МЕ/мл, данные по аналитической чувствительности коммерческого ИФА-теста для выявления анти-ВГЕ, и отечественный стандарт анти-ВГЕ с концентрацией 5 МЕ/мл, а также подтверждена диагностическая значимость теста для определения авидности анти-ВГЕ.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Результаты проведенного исследования позволяют подвести следующие итоги:

1. Чувствительность стандартной тест-системы для выявления анти-ВГЕ IgG составляет 0,25 МЕ/мл.
2. Чувствительность выявления РНК ВГЕ методом ОТ-ПЦР составляет 250 МЕ/мл при анализе РНК, выделенной из образцов менее 100 мкл, и 125 МЕ/мл при анализе РНК, выделенной из образцов более 100 мкл.
3. Концентрация анти-ВГЕ в разработанном стандартном образце антител к ВГЕ составляет 5 МЕ/мл.
4. Средняя концентрация анти-ВГЕ IgG у пациентов с ГЕ или у ранних реконвалесцентов составляет 12 МЕ/мл, у лиц, давно встречавшихся с ВГЕ – 5,5 МЕ/мл.
5. Тест на avidность анти-ВГЕ позволяет дифференцировать лиц с недавним контактом с ВГЕ и давно перенесших инфекцию.

### **Практические рекомендации**

1. Для повышения аналитической чувствительности выявления РНК ВГЕ в клинических образцах и объектах внешней среды объем анализируемого образца должен превышать 100 мкл.
2. Разработанный вторичный стандарт анти-ВГЕ может применяться в серологических тестах для оценки аналитической чувствительности выявления анти-ВГЕ и выражения полученных результатов в МЕ/мл.
3. Для дифференциации случаев недавнего контакта с ВГЕ и давно перенесенной инфекции у лиц, имеющих анти-ВГЕ IgG, целесообразно определять индекс avidности анти-ВГЕ. Величина индекса  $<20\%$  свидетельствует о недавней встрече организма с ВГЕ.

### **Список научных трудов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях:**

1. Потемкин И.А., Малинникова Е.Ю., Дьяррассуба А., Мохаммед А.М.Е., Щибрик Е.В., Поляков А.Д. Обнаружение антител к вирусу гепатита Е

- среди жителей Белгородской области. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/116-12499> (дата обращения: 22.03.2016)
2. Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., **Дьяррассуба А.**, Мохаммед А.М.Е., Землянский О.А., Поляков А.Д. Заболеваемость острым гепатитом Е в Российской Федерации // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/116-12532> (дата обращения: 22.03.2016)
3. Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Гаджиева О.А., Прохорова Е.Л., **Дьяррассуба А.**, Исаева О.В., Кожанова Т.В., Иванова О.Е., Силенова О.В., Сетдикова Н.Х., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность маркеров гепатита Е у детей. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - № 2. - С. 39-46.
4. Кюрегян К.К., **Дьяррассуба А.**, Михайлов М.И. Лабораторная диагностика вирусных гепатитов. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. - 2015. - № 2. - С. 26-36.

#### **Работы, опубликованные в других изданиях:**

1. **Дьяррассуба А.**, Лопатухина М.А., Потемкин И.А. Определение avidности антител к вирусу гепатита Е класса IgG для диагностики данной инфекции. // В мире вирусных гепатитов. – 2014. - №2. - С. 27-31.

#### **Список сокращений**

**Анти-ВГЕ** – антитела к вирусу гепатита Е

**Анти-ВГЕ IgG** - антитела к вирусу гепатита Е класса IgG

**Анти-ВГЕ IgM** - антитела к вирусу гепатита Е класса IgM

**ВГЕ** – вирус гепатита Е

**ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения

**ГЕ** – гепатит Е

**ИФА** – иммуноферментный анализ

**МЕ/мл** – международные единицы в миллилитре

**ОРС** – открытая рамка считывания

**ОТ-ПЦР** – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция

**РНК** – рибонуклеиновая кислота

**РФ** – Российская Федерация

## ДЬЯРРАССУБА АБДУЛАЙЕ (Республики Кот-д'Ивуар)

### Стандартизация методов лабораторной диагностики гепатита Е

Целью данного исследования являлось создание подходов к стандартизации лабораторной диагностики гепатита Е. Выполнены три ключевых этапа стандартизации – определение аналитической чувствительности молекулярного теста для выявления РНК ВГЕ; определение аналитической чувствительности в Международных единицах ИФА-теста, широко применяемого в России для выявления анти-ВГЕ; и создание отечественного референсного материала – стандарта анти-ВГЕ IgG, валидированного относительно Международного стандарта. В результате проведенных исследований получены инструменты для стандартизации лабораторной диагностики гепатита Е и эпидемиологического надзора за данной инфекцией – молекулярный тест для выявления РНК ВГЕ с чувствительностью в диапазоне 125-250 МЕ/мл, данные по аналитической чувствительности коммерческого ИФА-теста для выявления анти-ВГЕ (0,25 МЕ/мл), и отечественный стандарт анти-ВГЕ с концентрацией 5 МЕ/мл.

## DIARRASSOUBA ABDOULAYE (République de Côte d'Ivoire)

### Standardization of methods for the laboratory diagnosis of hepatitis E

The aim of this study was to develop approaches to standardization of laboratory diagnostics of hepatitis E. We have made three key stages of standardization - the definition of the analytical sensitivity of the molecular test for the detection of HEV RNA; determination of the analytical sensitivity in International Units of ELISA test, which is widely used in Russia for the detection of anti-HEV; and the establishment of national reference material - anti-HEV IgG standard, validated against WHO International Standard. As a result, tools for standardization of laboratory diagnostics and epidemiological surveillance for hepatitis E were developed - a molecular test for HEV RNA detection with a sensitivity in the range of 125-250 IU/ml, the data on analytical sensitivity for the commercial anti-HEV ELISA test (0.25 IU/ml), and national reference standard with anti-HEV concentration of 5 IU/ml.

Подписано в печать 01.06.2016  
Формат 60x84/16. Гарнитура Таймс.  
Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Объем 1,51 усл. печ. л. Тираж 100 экз. Заказ № 154

Отпечатано в ЗАО «Издательство ИКАР».  
Москва, ул. Академика Волгина, д. 6.  
Тел.: 936-83-28, 978-35-99. Тел./факс: 330-89-77  
[www.ikar-publisher.ru](http://www.ikar-publisher.ru)