

**Б.П. Челобанов, Г.Н. Афиногенова, И.О. Чешенко, Т.В. Шарова,  
А.В. Зырянова, С.Н. Велиев**

## **РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ В**

ООО НПО «БИОТЕСТ», Новосибирск  
ГУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

Сконструирована опытная партия иммунохроматографических экспресс-тестов для определения HBsAg в сыворотке крови. В тест-системе использовали пару моноклональных АТ специфичных к а детерминанте HBsAg и рекомбинантный HBsAg. Оптимизацию тест-системы проводили на образцах сыворотки здоровых доноров с добавлением рекомбинантного HBsAg. Чувствительность и специфичность полученной тест-системы определяли на стандартной панели сывороток, содержащих HBsAg разной субтиповой специфичности в концентрациях от 0,1 до 0,5 нг/мл и на сыворотках больных гепатитом В и здоровых доноров. Для выявления возможной кросс-реактивности использовали образцы сывороток больных гепатитами А и С, ВИЧ-инфицированных, больных с заболеваниями печени неинфекционной природы, пациентов после гемодиализа и беременных женщин. Разработанную тест-систему сравнивали с аналогичными экспресс-тестами различных фирм, а также с наборами для определения HBsAg методом ИФА. Установлено, что разработанная тест-система по специфичности не уступает ИФА и позволяет выявлять 0,25 нг/мл HBsAg в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** HBsAg, гепатит В, иммунохроматографический анализ

Вирусный гепатит В (ВГВ) — широко и повсеместно распространенная парентеральная инфекция человека, характеризующаяся симптомами поражения печени и интоксикации и определяющая большую часть летальности при вирусных гепатитах. За последние несколько лет в России регистрируемая заболеваемость находится на уровне 18-21 случая на 100000 человек в Европейской части и до 30-40 на Дальнем Востоке, в Тыве и Якутии [1]. Вирус гепатита В отличается исключительно высокой инфекционностью, вирулентностью и устойчивостью в условиях окружающей среды, что приводит к высокой частоте передачи данного вируса по сравнению с ВИЧ и ВГС. Установить вирусную природу гепатита и получить информацию об его этиологии возможно только путем выявления серологических маркеров вирусов гепатита [2]. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) является основным показателем инфицирования пациента вирусом гепатита В и представляет собой элемент защитной оболочки вируса. Концентрация HBsAg в крови у инфицированных вирусом гепатита В колеблется в очень широких пределах от 0,1 нг/мл до 0,5 мг/мл [3]. Основным резервуаром и источником заражения ВГВ являются лица с субклинической формой заболевания — вирусоносители, с концентрацией HBsAg от 0,1 до 0,5 нг/мл. Существование бессимптомного носительства ВГВ определяет ос-

новные трудности в борьбе с данной инфекцией [4]. В связи с этим, несмотря на уже существующие унифицированные методики диагностики ВГВ, необходимо внедрение в практику простых, надежных и быстрых, не требующих специальной аппаратуры скрининговых тестов, особенно для групп лиц с повышенным риском заболеваемости [5].

**Цель данного исследования** заключалась в разработке иммунохроматографических экспресс-тестов для определения четырех основных подтипов антигена HBsAg в сыворотке крови с чувствительностью не менее 0,25 нг/мл.

### **Материалы и методы**

Коллоидное золото получали согласно ТУ 9154-001-93099853-06. Содержание частиц золота в растворе определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 520 нм. Размер частиц и степень агрегации определяли методом трансмиссионной электронной микроскопии, с последующей обработкой компьютерной программой Image-Pro Plus V4.1 (Media Cybernetics, L.P.). Отклонение от номинального размера составляло не более 25%. Количество агрегирующих частиц составляло не более 3%.

В работе использовали моноклональные АТ HV-42, HV-101 и HV-102 («БИОСАН», Новосибирск), полученные против HBsAg субтипа ad, специфичные к а детерминанте и рекомби-

нантный HBsAg субтипа ауw («КОМБИОТЕХ», Москва). Конъюгаты моноклональных АТ с коллоидным золотом получали согласно [6]. Конъюгаты моноклональных АТ с биотином получали согласно [7].

При конструировании стрипов использовали различные пористые материалы, специально разработанные для иммунохроматографических тестов («Millipore», США; «Whatman», Великобритания; «Sartorius», Германия).

Нанесение тестовой и контрольной линии на нитроцеллюлозную мембрану и конъюгатов на подушки конъюгатов проводили на диспенсере DCI-210 («ZETACorporation», Корея). При оптимизации нанесения контрольной и тестовой линий варьировали концентрацию АТ (от 0,5 до 2 мг/мл), авидина (от 0,25 до 5 мг/мл) и HBsAg (от 0,1 до 1 мг/мл), буферную систему (буфер трис-НСl, боратный буфер, фосфатный буфер), рН (от 5 до 11), концентрацию метанола или этанола (от 1 до 10%), объем и скорость нанесения. При оптимизации нанесения конъюгата варьировали концентрацию конъюгатов АТ-биотин (от 0,02 до 1 мг/мл) и конъюгатов АТ-золото (от 2 до 10 ое), буферную систему (буфер трис-НСl, боратный буфер, фосфатный буфер), рН (от 7 до 9), концентрацию сахарозы (от 1 до 10%), объем и скорость нанесения. После нанесения реагентов нитроцеллюлозную мембрану и подушки конъюгатов сушили в вакуумной сушилке Vacuum Drying Oven («ZETACorporation», Корея) и хранили в эксикаторе при относительной влажности < 20%.

Для определения чувствительности и специфичности тест-системы использовали «Контрольную панель сывороток, содержащих и не содержащих HBs-антиген» («Медико-биоло-

гический союз», Новосибирск), «Стандартную панель сывороток, содержащих и не содержащих HBsAg», («Вектор-Бест», Новосибирск) и образцы сывороток больных гепатитами А, В или С, ВИЧ-инфицированных пациентов, больных с заболеваниями печени неинфекционной природы, пациентов после гемодиализа, беременных женщин и здоровых доноров (образцы сывороток были предоставлены, с согласия больных, специализированными лечебно-профильными отделениями клиник г. Новосибирска).

Для сравнительного анализа чувствительности экспресс-тестов различных производителей были взяты следующие иммунохроматографические тест-системы для определения HBsAg: Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Test («IND Diagnostic», Канада), HBsAg Rapid Hepatitis B Surface Antigen Test Device («ACON Laboratories», США), SD HBsAg («Standard Diagnostic», Корея), HBsAg Hepatitis B Surface Antigen Test («Wondfo Biotech. Co.», Китай), ИХА-HBsAg-Фактор («ФАКТОР-МЕД», Россия).

### Результаты

Иммунохроматографический тест представляет собой диагностическую панель (Рис. 1), состоящую из подушки для внесения образца; подушки конъюгата, содержащей антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (Рис. 1, схема 1) или двух подушек конъюгата — вторая подушка содержит антитела, конъюгированные с биотином (Рис. 1, схема 2); нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными на тестовой линии антителами (Рис. 1, схема 1) или авидином (Рис. 1, схема 2) и с иммобилизованными на контрольной линии антигенами; абсорбирующей подушки. После внесения образца антигены образца взаимодей-

Схема 1

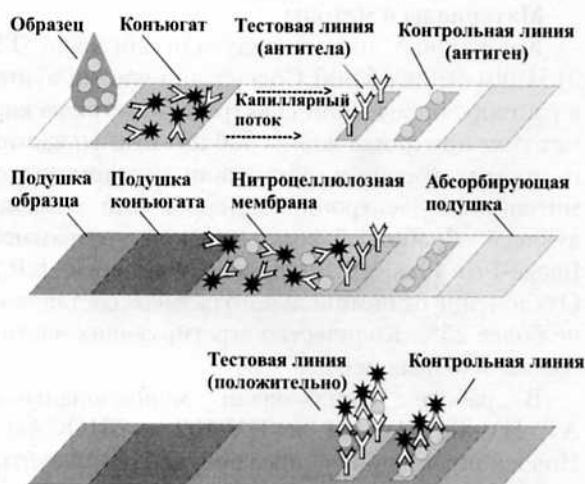


Схема 2



Рис. 1. Устройство и принцип работы иммунохроматографических тестов

твуют с конъюгатами антител, нанесенными на подушку конъюгата. Образовавшийся окрашенный иммунный комплекс движется под действием капиллярных сил вдоль нитроцеллюлозной мембраны и взаимодействует с иммобилизованными на тестовой линии антителами (Рис. 1, схема 1) или авидином (Рис. 1, схема 2). В результате появляется одна окрашенная сиренево-розовая полоска. Не связавшиеся на тестируемой полосе антитела, мигрируют далее вдоль нитроцеллюлозной мембраны и взаимодействуют с иммобилизованными на контрольной линии антигенами. В результате появляется вторая окрашенная сиренево-розовая полоска. Если анализ проведен правильно, контрольная линия должна проявляться всегда, независимо от присутствия исследуемого антигена в образце биологической жидкости.

Обычно в иммунохроматографических тест-системах используют схему 1, поскольку схема 2 хотя и позволяет добиться большей чувствительности, но требует больше затрат и более сложна в разработке. Нами были отработаны оба варианта постановки иммунохроматографического анализа на HBsAg, при этом были проверены различные материалы в качестве подушки образца, подушки конъюгата, абсорбирующей подушки, подобраны подходящие мембраны и оптимизированы условия нанесения реагентов (см. «материалы и методы»).

Основными показателями каждой разрабатываемой тест-системы являются чувствительность и специфичность. Для определения аналитической чувствительности полученных тест-систем готовили ряд серийных разведений, охватывающих диапазон концентрации от 50 до 0,1 нг/мл рекомбинатного HBsAg в донорской сыворотке. Было показано, что разработанные тест-системы на HBsAg (схема 1 и схема 2) обладают чувствительностью 5 и 0,25 нг/мл соответственно (Рис. 2). Выбранная по результатам проведенной работы схема 2 была положена в основу конструкции экспресс-теста на HBsAg («HBsAg-BioTest»), который был подвергнут дальнейшим лабораторным испытаниям.

Поскольку время проявления тестируемой полосы зависит от концентрации антигена в сыворотке (Рис. 3), время окончательного учета

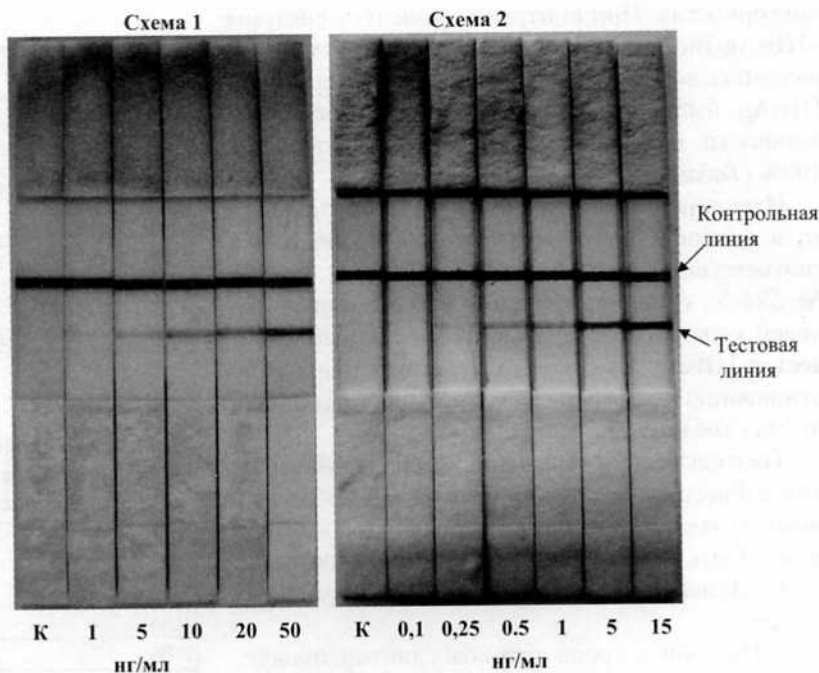


Рис. 2. Аналитическая чувствительность ИХА тестов на HBsAg

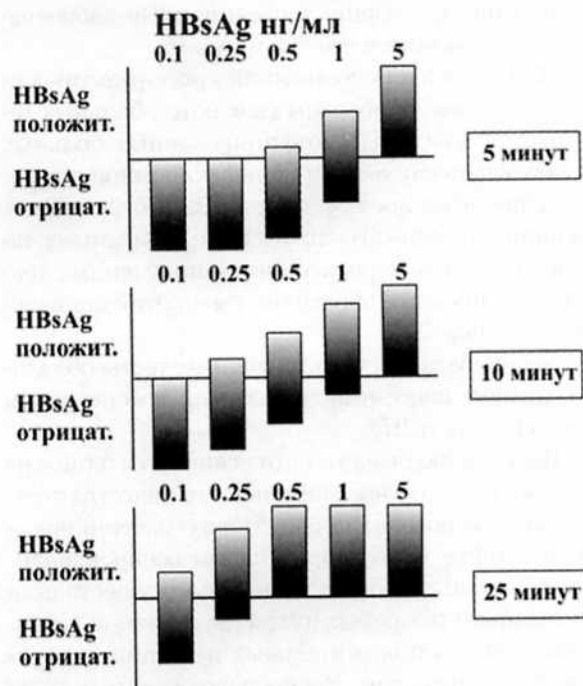


Рис. 3. Зависимость скорости проявления тестовой линии от концентрации HBsAg в образце

результата регистрировали по выявлению самой меньшей концентрации HBsAg. В нашем случае за 25 мин выявляется достоверно 0,25 нг/мл HBsAg, в сыворотке больного.

Изучение специфичности и чувствительности сконструированного теста проводили по утвержденным стандартам, используя две утвержденные ГИСКом стандартных панели сывороток, согласно прилагаемой инструкции, в трехкратной

Таблица

**Характеристики ИХА тест-системы на HBsAg**

Показатели	Тип образца	HBsAg
Диагностическая чувствительность	Позитивные образцы	100%
	Сероконверсионные панели	100%
Аналитическая чувствительность	Стандарты	0,25 нг/мл
Диагностическая специфичность	Здоровые доноры	97%
	Госпитализированные пациенты	100%
	Потенциально кросс-реактивные образцы	97%

Таблица 2

**Данные по кросс-реактивности тестов «HBsAg» с сыворотками пациентов, взятых из различных специализированных отделений**

Заболевание	Количество образцов	«HBsAg»	
		Положительные	Отрицательные
HAV	4	1*	3
HBV	15**	15	0
HCV	5	0	5
ВИЧ 1+2	3	0	3
Пациенты после гемодиализа	3	0	3
Здоровые доноры	30***	1	29
Беременные	10***	0	10
Больные с заболеваниями печени неинфекционной природы	10***	0	10

Примечание: \* – слабopоложительный (концентрация HBsAg в крови не выше 0,25 нг/мл). \*\* – положительные образцы, были взяты у пациентов на разных стадиях болезни. \*\*\* – отрицательные образцы, используемые для оценки теста, были взяты у целевых групп, для которых предназначен тест, таких как доноры, госпитализированные пациенты, беременные женщины.

образцы сывороток здоровых доноров с добавлением рекомбинантного HBsAg в различных концентрациях и образцы сывороток больных гепатитом В, клинически охарактеризованные методом ИФА (тест система «Вектоген В – HBs-антиген», ЗАО «Вектор-Бест»), содержащих концентрации антигена, позволяющие произвести качественную и количественную оценку чувствительности. Полученные результаты представлены в таблице 3. Видно, что разработанная нами конструкция экспресс-теста находится на первом месте по чувствительности среди аналогичных ИХА тест-систем отечественных и зарубежных производителей

Таким образом, разработанная нами тест-система достоверно выявляет 0,25 нг/мл HBsAg в крови человека (чувствительность теста составила 100%, специфичность – 97%). Данная тест-система может быть рекомендована для обследования населения в небольших диагностических лабораториях, не имеющих специального оборудова-

повторностях. При контроле серий тест-системы «HBsAg-BioTest», проведенных на стандартной панели сывороток, содержащих и не содержащих HBsAg, были установлены показатели чувствительности и специфичности, соответствующие 100% (Таблица 1).

Изучение аналитической чувствительности и специфичности тест-системы проводили в соответствии с указанием МЗ РФ от 01.04.2002 № 524-У, с использованием утвержденных панелей сывороток содержащих различные количества HBsAg. Показатели чувствительности по отношению к референс-препарату составили 0,25 нг/мл (Таблица 1).

Тест-системы, разрешенные для использования в России, обязаны учитывать эффекты возможной кросс-реактивности, появление которой может быть обусловлено следующим причинами:

1. Изменение состава крови у беременных женщин.
2. Наличие в крови антикоагулянтов, продуктов гемолиза.
3. Аутоиммунные заболевания.
4. Сопутствующие инфекционные заболевания, передающиеся половым путем.

Для выявления возможной кросс-реактивности использовали образцы сывороток больных гепатитами А и С, ВИЧ-инфицированных, больных с заболеваниями печени неинфекционной природы, пациентов после гемодиализа и беременных женщин. Результаты проведенных анализов по выявлению кросс-реактивности полученных тестов с различными образцами сывороток приведены в таблице 2.

Было показано, что полученные тесты обладают низкой кросс-реактивностью, демонстрируя специфичность 97%.

Воспроизводимость метода является одним из важных показателем стабильности качества тест-системы, и обычно проводят внутрисерийное и межсерийное испытания. Оценка воспроизводимости одной серии тест-системы осуществляли на выборке сывороток, путем двухкратной постановки восьми положительных и восьми отрицательных сывороток. Воспроизводимость метода в пределах одной серии показала 100% совпадение результатов с исходными показателями сывороток.

Межсерийная воспроизводимость определялась для тех же 8 проб (отрицательных и положительных), путем тестирования 3 разных партий. Отрицательные и положительные результаты тестов также были верными в 98% случаев.

Качество экспресс-тестов оценивали так же путем сравнения с тест-системами других производителей. В качестве образцов были взяты

Таблица 3

**Сравнительная характеристика различных ИХА  
тест-систем на HBsAg**

HBsAg, нг/мл	5	1	0,5	0,1
«HBsAg-BioTest», Схема 1 ООО «Биотест», Россия	**	*	-	-
«HBsAg-BioTest», Схема 2 ООО «Биотест», Россия	***	**	**	*
Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Test IND Diagnostic, Канада	***	**	*	-
HBsAg Rapid Hepatitis B Surface Antigen Test Device ACON Laboratories, США	***	**	-	-
SD HBsAg Standard Diagnostic, Корея	***	**	*	-
HBsAg Hepatitis B Surface Antigen Test Wondfo Biotech. Co., Китай	**	*	-	-
ИХА-HBsAg-Фактор ООО «ФАКТОР-МЕД», Россия	**	*	-	-

*Примечание: \*\*\* – контрольная и тестовая линии окрашены с одинаковой интенсивностью или тестовая линия окрашена сильнее, чем контрольная – сильноположительный ответ. \*\* – тестовая линия окрашена слабее, чем контрольная – среднеположительный ответ; \* – тестовая линия окрашена слабо, контрольная – интенсивно окрашена – слабоположительный ответ.*

дования и высококвалифицированного персонала, для быстрого обследования индивидуального донора доноров крови, органов и тканей человека в неотложных ситуациях или при отсутствии лабораторного оборудования. Кроме того, надежность, объективность и простота в применении позволяет использовать тест в качестве домашней диагностики.

**DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHY TESTS FOR RAPID DIAGNOSTICS OF VIRAL HEPATITIS TYPE B PATIENTS**

B.P. Chelobanov, G.N. Afinogenova, I.O. Cheshenko, T.V. Sharova, A.V. Zyrianova, S.N. Veliev

A pilot lot of Immunochromatographic express-tests for detection of HBsAg in a blood serum is constructed. In the test-system a couple of monoclonal antibodies specific to «a» determinant of HBsAg and recombinant HBsAg were used. Test system optimization was made on the serum samples of healthy donors with supplement of recombinant HBsAg. The sensitivity and specificity of obtained test system

were detected on the standard panel of serums, containing HBsAg of various subtypes in the concentration of 0,1 to 0,5 ng/ml and on the serums of hepatitis B recipients and healthy donors. To reveal a possible cross-reactivity, the serum samples of hepatitis A and C patients, HIV infected, patients with hepatic diseases of noninfectious nature, of patients after hemodialysis and pregnant women were used. This new constructed test system was compared with similar express test systems of various companies and also with the ELISA kits for detection of HBsAg. It was found that constructed test system does not yield to ELISA on its specificity and allows to detect 0,25 ng/ml of HBsAg in blood serum.

**Литература**

1. Субтипы HbsAg вируса гепатита В в Западной Сибири / И.Г. Нетесова, Р.Д. Swenson, Т.В. Калашникова и др. // Вопр. вирусол. – 2004. – Т. 49. – № 1. – С. 17-20.
2. Маркеры вирусного гепатита В у южных алтайцев пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай). Субтипирование HBsAg изолятов ВГВ с помощью моноклональных антител / И.Г. Нетесова, Р.Д. Swenson, Л.П. Осипова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2001. – № 2. – С. 29-33.
3. Courouze, A.M. Screening for markers of infections transmitted by transfusions in the blood collected in France from 1996 to 1998 / A.M. Courouze, J. Pillonel, C. Saura // Transfus. Clin. Biol. – 2000. – Vol. 7. – № 2. – P. 153-170.
4. Аитов К.А. Течение парентеральных вирусных гепатитов у наркоманов / К.А. Аитов, Ю.К. Плотникова, Н.К. Боброва // Ж. инфекц. патол. – 2003. – Т. 10. – № 4. – С. 11-12.
5. Дифференциальная лабораторная иммунодиагностика вирусных гепатитов, методические указания / А.А. Новик, В.Н. Цыган, В.Ю. Никитин и др. – М., 2002. – 74 с.
6. Dykman L.A. Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies / L.A. Dykman, L.Yu. Matora, V.A. Bogatyrev // J. Microbiol. Meth. – 1996. – Vol. 24. – P. 247-248.
7. Моул С. Получение моноклональных антител к гибридным белкам, продуцируемым в клетках E. coli / С. Моул, Д. Лейн; под ред. Д. Гловера. // Новое в клонировании ДНК. Методы: Пер. с англ. – М., 1986. – С. 171-207.