

УДК 578.001.53

**Т.В. Затовська<sup>1</sup>, Н.В. Нестерова<sup>1</sup>, Г.В. Баранова<sup>1</sup>,  
С.Л. Рибалко<sup>2</sup>, С.Д. Загородня<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел. +38 (044) 526 61 68, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут епідеміології та інфекційних захворювань імені Л.В. Громашевського АМН України,  
вул. М. Амосова, 5, Київ 03680, Україна,  
тел. +38(044) 275 83 00, e-mail: y\_Dasha@ukr.net

## **ДЕТЕКЦІЯ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ ДО ВПГ-1 ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИЧНОГО БІОСЕНСОРА**

**Мета.** Дослідити можливість використання оптоелектронного біосенсора «Плазмон-6» на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для детекції специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1). **Методи.** ВПГ-1 накопичували в культурі епітеліальних клітин нирки теляти MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) та очищали шляхом диференційного центрифугування в градієнті щільності хлористого цезію. Наявність вірусних білків перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Вірусні білки наносили на поверхню біочипу, попередньо модифіковану декстраном. Відбір сироваток крові людей здійснювали методом ІФА з використанням тест-систем «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Росія). Біосенсорний аналіз проводили на оптоелектронному спектрометрі «Плазмон-6». **Результати.** Одержано концентрований препарат білків ВПГ-1 і показано, що нанесення білків у кількості  $8 \times 10^{-5}$  мг/мм<sup>2</sup> було оптимальним для виявлення антитіл до ВПГ-1. На біочипах було протестовано 10 негативних до ВПГ-1 сироваток крові донорів для визначення меж позитивного і негативного відгуку. Проведено порівняльний аналіз 25 сироваток крові хворих на наявність антитіл до ВПГ-1 методами ІФА і ППР. Збіг за обома методами був у 24 з 25 випадків. **Висновки.** В результаті проведених досліджень показано, що імуносенсорний аналіз з використанням приладу «Плазмон-6» дозволяє виявляти специфічні антитіла до ВПГ-1 в сироватках крові хворих на рівні з традиційними підходами.

*Ключові слова:* ППР-аналіз, біочип, антитіла до ВПГ-1.

Представники родини *Herpesviridae*, котрим притаманна як гостра, так і персистуюча форма розвитку інфекції, є одними з найпоширеніших серед патогенних для людини вірусів, зокрема, вірус простого герпесу 1-го типу (ВПГ-1). Інфікування людини цим вірусом проявляється у вигляді пухирців навколо губ або носа. ВПГ-1 має тропізм до нервової тканини і може викликати як гострі, так і хронічні захворювання центральної та периферійної нервової системи і бути причиною таких захворювань як енцефаломієліти, арахно-енцефаліти, полінейропатії та ін. [3, 5]. За даними ВООЗ захворювання, що

© Т.В. Затовська, Н.В. Нестерова, Г.В. Баранова, С.Л. Рибалко, С.Д. Загородня, 2015



спричинюються вірусами простого герпесу, посідають друге місце (15,8 %) після грипу як причина смерті від вірусних інфекцій. Сучасні методи діагностики даного захворювання базуються на імунохімічних методах (ІФА, МФА) та молекулярно-біологічних (ПЛР). Останнім часом все більшого значення для діагностики захворювань, спричинених вірусами та бактеріями, набуває застосування оптичних біосенсорів [1, 13].

Після того, як наприкінці минулого сторіччя на світовому ринку з'явився перший серійний оптичний біосенсор, який дозволив з високою точністю реєструвати в реальному часі взаємодію макромолекул, багато дослідників стали використовувати його у біохімічних, фармакологічних і медичних цілях. В Україні в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАНУ створені оптоелектронні спектрометри на основі явища ППР серії «Плазмон», які успішно використовуються українськими дослідниками у галузі біології та медицини, а саме, для дослідження білок-білкових взаємодій в системі гемостазу крові людини і для розробки експрес-методу ранньої діагностики загрози тромбоутворення при захворюваннях серцево-судинної системи [8], для ранньої діагностики розвитку пухлин [9], виявлення антитіл проти вірусу лейкозу в сироватках молока великої рогатої худоби [7]. Суттєвими перевагами біосенсорного аналізу є те, що він не потребує будь-якої мітки, виконується за короткий проміжок часу, характеризується високою чутливістю [12]. У зв'язку з цим дослідження, направлені на використання методу ППР для розробки діагностикуму, який дозволить виявляти інфекцію, спричинену ВПГ-1, є досить актуальними. Метою даної роботи було дослідження можливості використання оптоелектронного біосенсора «Плазмон-6» на основі ППР для детекції специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу в сироватках крові людей.

### Матеріали і методи

Вірус простого герпесу 1 типу (штам УС) був отриманий з Інституту антивірусної хіміотерапії Центру клінічної та теоретичної медицини (Німеччина). Для очистки вірусу використовували надосадову рідину з культури епітеліальних клітин MDBK, наданої Інститутом органічної хімії з центром фітохімії Болгарської академії наук. ВПГ-1 очищували за стандартною методикою в градієнті щільності CsCl з наступною дезінтеграцією вірусу для вивільнення капсидних білків [2]. Наявність вірусних білків в очищеному препараті визначали методом електрофорезу у 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН) за стандартною методикою Laemmli [10]. Молекулярні маси білків вихаровували за допомогою програми Total Lab (версія 2.1). Концентрацію білка у вірусному препараті визначали за допомогою спектрофотометра «DeNovix DS-11» (Німеччина). Специфічну активність антигену виявляли непрямим твердофазним імуноферментним аналізом [4] із застосуванням комерційної сироватки до ВПГ-1 («Дако», Данія).

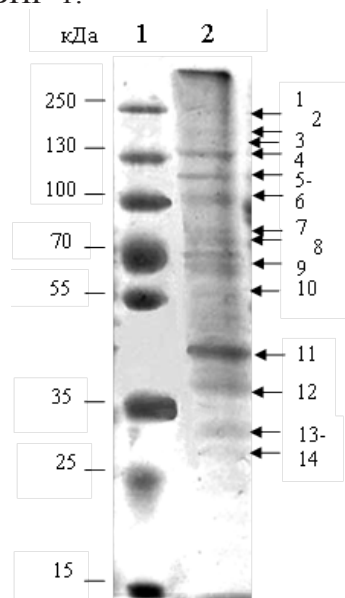
В роботі були використані 25 сироваток крові хворих, отриманих з клінічної лікарні м. Києва, і 10 сироваток крові донорів.



Імуноферментний аналіз сироваток крові з використанням комерційних тест-системи «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) і «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Росія) проводили за інструкцією виробника. Його результати слугували контролем достовірності результатів, отриманих за допомогою оптичного біосенсора. Підготовку біочипів і біосенсорний аналіз проводили як описано нами раніше [6]. Дослідження виконували на двоканальному оптоелектронному ППР-спектрометрі «Плазмон-6». Статистичну обробку виконували за стандартною методикою, використовуючи програму Origin 7.0.

### Результати та обговорення

Для виявлення антитіл до ВПГ-1 у сироватках крові людей як антиген використовували вірусні білки, очищені з накопиченого в культурі клітин вірусу. Наявність вірусних білків і чистоту отриманого препарату характеризували за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН (рис. 1). На електрофореграмі було виявлено білкові смуги, які за розрахованими молекулярними масами відповідали білкам ВПГ-1 з молекулярними масами: 175 кДа, 155 кДа, 132 кДа, 126 кДа, 112–118 кДа, 88 кДа, 80 кДа, 74 кДа, 59 кДа, 48 кДа, 44 кДа, 33 і 30 кДа, описаними в літературі [11]. Концентрація білка в одержаному препараті становила 8 мг/мл. Для підтвердження специфічної активності очищених вірусних білків проводили непрямий твердофазний імуноферментний аналіз з комерційною сироваткою до ВПГ-1. Позитивний результат спостерігався навіть при розведенні препарату 1:12000, що свідчить про високий вміст білків вірусу та їх відповідність ВПГ-1.

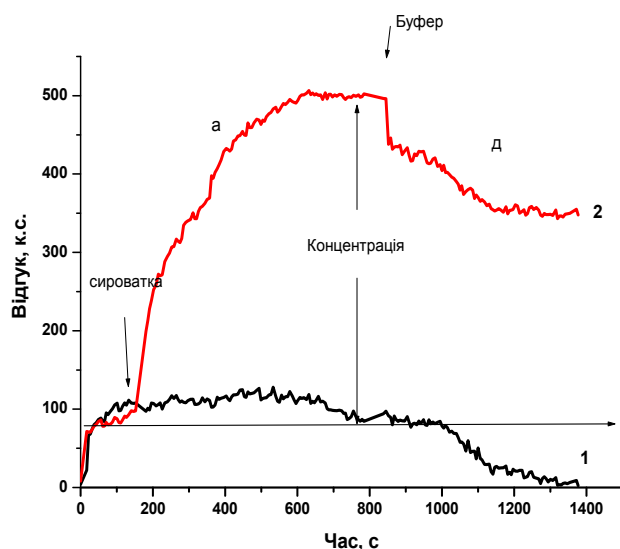


**Рис. 1. Електрофореграма білків очищеного препарату ВПГ-1**  
(1 – маркери молекулярної маси ; 2 – препарат ВПГ-1)

**Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified preparation of HSV-1**  
(1 – MW markers, 2 – purified preparation of HSV-1)

Таким чином, було отримано та охарактеризовано концентрований препарат білків ВПГ-1, який використовували як антиген для виявлення в сироватках крові специфічних антитіл до даного вірусу методом ППР.

При розробці імуносенсорного біочипа проводили іммобілізацію вірусних білків на його поверхні з попереднім нанесенням 0,2 % розчину декстрана 17 000 (Sigma) як полімерної основи. Спостерігали зростання резонансного відгуку на позитивну в імуноферментному аналізі сироватку та відсутність реакції з негативною сироваткою. Типова сенсограма біосенсорного аналізу представлена на рис. 2.



**Рис. 2.** Типова сенсограма, яка відображує кінетику міжмолекулярного зв'язку іммобілізованих вірусних білків (антигену) з антитілами позитивної (1) і негативною (2) сироваток.

Фаза (а) відповідає процесу асоціації при контакті антитіл сироватки з іммобілізованим антигеном, фаза (д) відповідає процесу дисоціації, після заміни сироваток у протоці на цитратний буфер. К. с. – кутові секунди.

**Fig. 2.** Typical sensogram is showing the kinetics of intermolecular bonds of immobilized viral proteins with antibodies of positive (1) and negative (2) sera.

Phase (a) corresponds to the association process during contact of serum antibodies with immobilized antigen, phase (d) corresponds to the dissociation process after replacement of serum in the cell by citrate buffer. A. s. – angle seconds.

Отримані таким чином біочипи використовували в контрольних експериментах по виявленню специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу в сироватках крові людей.

Щоб підібрати оптимальну концентрацію антигену для аналізу сироваток, вірусний препарат наносили на біочипи у декількох розведеннях в інтервалі 1:4000–1:500. Було виявлено прямий зв'язок між концентрацією вірусного матеріалу і отриманим відгуком на позитивну в імуноферментному аналізі сироватку (Рис. 3).

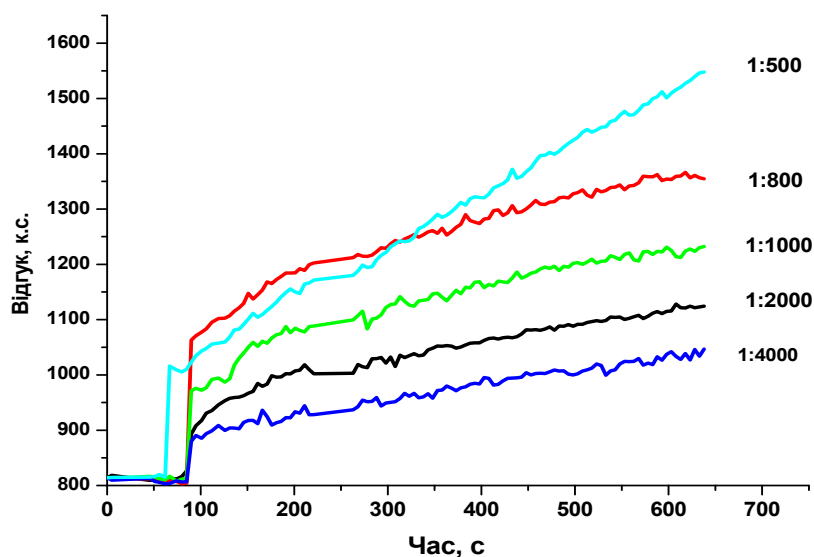


Рис. 3. Криві залежності відгуку на позитивну сироватку від концентрації іммобілізованого антигена

Fig. 3. Dependence of response on positive serum from concentration of immobilized antigen

Максимальний відгук на позитивну сироватку спостерігався при розведенні 1:500, що відповідає концентрації  $8 \times 10^{-5}$  мг/мм<sup>2</sup> вірусних білків на поверхні біочипа. Використання розчину антигену у вищій концентрації не призвело до значного підвищення відгуку на позитивну сироватку. При додаванні негативної сироватки не спостерігалось залежності відгуку від концентрації антигену. Ці результати свідчать про специфічність зв'язку іммобілізованих на біочипі білків ВПГ-1 з антитілами сироватки крові.

Для дослідження можливості застосування створених біочипів для виявлення антитіл до ВПГ-1 у сироватках крові хворих, проводили порівняльний аналіз сироваток методами ППР та імуоферментного аналізу.

З метою визначення меж позитивного і негативного відгуку в біосенсорному аналізі було протестовано 10 сироваток крові донорів, які за результатами ІФА були негативними до ВПГ-1. За отриманими результатами вираховували середнє значення і стандартне відхилення. З цих значень було вираховано граничне значення для даної серії біочипів, яке становило  $185 \text{ к.с.} \pm 65 \text{ к.с.}$  (середнє значення плюс два стандартних відхилення). Відповідно, сироватки, які при ППР-аналізі мали значення відгуку більше ніж 250 к.с., вважалися позитивними, а сироватки, що давали відгук менше 250 к.с., – негативними. Результати аналізу 25 сироваток крові хворих, які за даними імуоферментного аналізу мали високий титр антитіл до ВПГ-1 наведені в таблиці 1 (для кожної сироватки проводили 4-кратне вимірювання).

Дослідження сироваток крові людей на вміст антитіл до ВПГ-1 імунохімічним та імуносенсорним методами

Table 1

Investigation of human blood sera on the content of antibodies to HSV-1 by the immunochemical and immunosensor methods

№	Результат ППР (к.с. – кутові секунди)	Результат ІФА (ОО – оптичні одиниці)
1	367 к.с.	0,569
2	312 к.с.	0,588
3	339 к.с.	0,587
4	518 к.с.	0,667
5	549 к.с.	0,711
6	427 к.с.	0,640
7	547 к.с.	0,806
8	476 к.с.	0,808
9	460 к.с.	0,723
10	863 к.с.	1,050
11	564 к.с.	0,823
12	839 к.с.	0,95
13	598 к.с.	0,652
14	371 к.с.	0,542
15	383 к.с.	0,514
16	447 к.с.	0,587
17	589 к.с.	0,705
18	721 к.с.	0,910
19	837 к.с.	1,286
20	696 к.с.	0,819
21	1264 к.с.	1,414
22	452 к.с.	0,669
23	225 к.с.	0,417
24	718 к.с.	0,842
25	348 к.с.	0,497



Встановлено, що 24 з 25 сироваток хворих, позитивних за результатами імуноферментного аналізу, були позитивними і при тестуванні методом ППР. Одна сироватка (№ 23) була негативною за результатами аналізу ППР, але позитивною за даними ІФА. Одержані дані свідчать про великий відсоток співпадання результатів (96 %) аналізу методами ІФА та ППР, що підтверджує можливість використання оптоелектронного пристрою «Плазмон-б» для виявлення специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу.

Таким чином, в результаті проведених досліджень одержані біочипи з сорбованими на декстрановій основі сумарними білками вірусу простого герпесу 1-го типу та встановлено їх оптимальну концентрацію для детекції антитіл. Проведений аналіз клінічних зразків (25 сироваток крові хворих) за допомогою оптоелектронного ППР-спектрометра «Плазмон-б» дозволяє стверджувати про здатність одержаного імуносенсорного чипа виявляти специфічні антитіла до ВПГ-1 в сироватках крові людей, оскільки співвідношення результатів класичного методу ІФА та ППР аналізу становить 96 %. У попередні роки нами були проведені дослідження, які довели можливість застосування ППР-спектрометра «Плазмон-б» в медицині для діагностики аденовірусної і ВЕБ-інфекцій [6]. Даними дослідженнями ми розширюємо спектр використання цього приладу для детекції вірусних патогенів, шкідливих для здоров'я людини.

Т.В. Заговская<sup>1</sup>, Н.В. Нестерова<sup>1</sup>, Г.В. Баранова<sup>1</sup>,  
С.Л. Рыбалко<sup>2</sup>, С.Д. Загородня<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, ул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,

тел.: +38 (044) 526 61 38, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут епідеміології та інфекційних захворювань

імені Л. В. Громашевського АМН України, ул. Амосова, 5, Київ, 03680, Україна, тел.: +38(044) 275 83 00, e-mail: y\_Dasha@ukr.net

## ДЕТЕКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВПГ-1 С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

### Реферат

**Цель.** Исследовать возможность использования оптоэлектронного биосенсора «Плазмон-б» на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для детекции специфических антител к вирусу простого герпеса 1 типа (ВПГ-1).

**Методы.** ВПГ-1 накапливали в культуре эпителиальных клеток почки теленка MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) и очищали путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Наличие вирусных белков проверяли методом электрофореза в полиакриламидном геле. Вирусные белки наносили на поверхность биочипа, предварительно модифицированную декстраном. Отбор сывороток крови людей осуществляли методом ИФА с использованием тест-систем «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) и «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Россия). Биосенсорный анализ выполняли на оптоэлектронном спектрометре «Плазмон-б». **Результаты.** Получен концентрированный препарат белков ВПГ-1 и показано, что нанесение на чип белков в количестве  $8 \times 10^{-5}$  мг/мм<sup>2</sup> было оптимальным для детекции антител к ВПГ-1. На биочип-



пах было протестировано 10 отрицательных к ВПГ-1 сывороток крови для определения границ положительного и отрицательного отклика. Проведен сравнительный анализ методами ИФА и ППР 25 сывороток крови больных на присутствие антител к ВПГ-1. Совпадение по результатам ППР-анализа и ИФА было в 24 из 25 случаев. **Выводы.** В результате проведенных исследований показано, что иммуносенсорный анализ с использованием прибора «Плазмон-6» позволяет выявлять специфические антитела к ВПГ-1 в сыворотках крови больных на уровне с традиционными подходами.

*Ключевые слова:* ППР-анализ, биочип, антитела к ВПГ-1.

**T.V. Zatovska<sup>1</sup>, N.V. Nesterova<sup>1</sup>, G.V. Baranova<sup>1</sup>,  
S.L. Rybalko<sup>2</sup>, S.D. Zagorodnia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 61 38, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

<sup>2</sup>Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, 5, Amosova Str., 03038, Kyiv, Ukraine, tel.: +38(044) 275 83 00, e-mail: y\_Dasha@ukr.net

## DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO HSV-1 WITH THE OPTICAL BIOSENSOR

### Summary

**Aim.** To investigate the possibility of using the optoelectronic biosensor «Plasmon-6» based on surface plasmon resonance (SPR) for detection of specific antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1). **Methods.** HSV-1 was propagated in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cell culture and was purified by differential centrifugation in cesium chloride density gradient. The presence of viral proteins was tested by polyacrylamide gel electrophoresis. Viral proteins were applied on the biochip surface pre-modified by dextran. Selection of human blood sera was performed by ELISA using the test systems «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, USA) and «HSV-1 IgG ELISA» (Vector-Best, Russia). Biosensor analysis was carried out on the optoelectronic spectrometer «Plasmon-6». **Results.** Concentrated preparation of HSV-1 proteins was obtained. It was shown that application of viral proteins at  $8 \times 10^{-5}$  mg / mm<sup>2</sup> was optimal for detection of antibodies against HSV-1. 10 negative to HSV-1 blood sera of donors have been tested on biochips to determine the limits of positive and negative response. The comparative analysis of 25 blood sera of the patients for detection the antibodies to HSV-1 was carried out by ELISA and SPR methods. The coincidence of the results of SPR-analysis and ELISA was in 24 of 25 cases. **Conclusion.** As a result of carried out investigations there were shown that immunosensor analysis using the device «Plasmon-6» as well as traditional approaches allowed to detect specific antibodies to HSV-1 in blood sera.

*Key words:* SPR analysis, biochip, antibodies to HSV-1.





### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Болтовец П. М., Нестерова Н. В. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, № 3. – С. 86–98.
2. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
3. Гервазиева В.Б., Самойликов П. В. Взаимодействие вирусов семейства *Herpesviridae* с иммунной системой человека // Аллергология и иммунология. – 2010. – 11, № 1. – С. 31–41.
4. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: – Высшая Школа, 1991. – 288 с.
5. Исаков В. А., Борисова В. В., Исаков Д. В. Герпес. Патогенез и лабораторная диагностика. – СПб.: – издательство «Лань», 1999. – 192 с.
6. Нестерова Н. В., Рыбалко С. Л., Загородня С. Д., Баранова Г.В., Головань А. В. Иммуносенсорная тест-система для выявления антител к вирусу Эпштейна-Барр // Биотехнология. – 2012. – 5, № 1. – С. 100–105.
7. Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф., Нагаева Л.И. Визначення рівня антитіл проти вірусу лейкозу в сироватці молока великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора // Укр. Біохім. журн. – 2005. – 77, № 2. – С. 166–168.
8. Урвант Л. П., Макогоненко Є.М., Березницький Г.К., Луговська Н.Е., Луговської Е.В., Пидюра М.О., Позняк Т.А., Сторожилова Н.С., Комісаренко С.В. Відщеплення фібринопептиду А викликає структурні перебудови в 118-134 ділянці В $\beta$ -ланцюга молекули фібрин (оген) у // Доп. Нац. Акад. Наук України. – 2012. – № 7. – С. 170–175.
9. Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R., Maslov V., Samoylov A., Ushenin Yu., Shirshov Yu. Surface plasmon resonance biosensor // Sensors & Transducers. – 2013. – 149, № 2. – P. 60–68.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
11. Loret S., Guay G., Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions // J. Virol. – 2008. – 82, № 17. – P. 8605–8618.
12. Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. Surface plasmon resonance biosensing // Meth. Mol. Biol. – 2009. – 503. – P. 65–68.
13. Rebecca L. Caygill, Blair G.E., Millner P.A. A review on viral biosensors to detect human pathogens // Anal. Chim. Acta. – 2010. – 681, № 1–2. – P. 8–15.

Стаття надійшла до редакції 23.06.2015 р.

