

23. Qin X. Resurgence of Pertussis and its laboratory diagnosis. Clin. Microbiol. Newsletter. 2015, 37(9): 69-76. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.04.001.
24. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of Bordetella pertussis polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. J. Pediatric Infect. Dis. Soc. 2014, 3(4): 347-349. doi: 10.1093/jpids/piu004.

Поступила 05.03.18

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹, А.В.Милованова¹,
Ю.И.Аммур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, С.В.Жаворонок³, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 3 ГЕНОТИПА И ОЦЕНКА ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва, Россия; ³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Разработка рекомбинантного полипептида — аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 3 генотипа. *Материалы и методы.* Штаммы Escherichia coli, плазмидные векторы, биологические и клинические образцы, молекулярно-биологические, биоинформационные, биохимические, биотехнологические, серологические методы. *Результаты.* Из фекальных экстрактов от свиней из хозяйств Белгородской обл. выделена РНК, которая использована в ОТ-ПЦР для получения фрагмента гена orf3 ВГЕ 3 генотипа. С помощью А/Т-клонирования получена рекомбинантная плаزمиды со вставкой фрагмента ДНК (230 п.н.), кодирующего N-концевой участок белка ORF3. Рассчитана первичная структура недостающего С-концевого участка белка. Для повышения выхода целевого продукта в клетках E.coli проведена оптимизация кодонов последовательности ДНК, кодирующей полноразмерный белок ORF3. Рассчитанный фрагмент ДНК был химически синтезирован и использован при конструировании рекомбинантной плазмиды экспрессии. Получен рекомбинантный штамм E.coli — продуцент белка ORF3 в составе слитного с β-галактозидазой полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и хроматографически очищен. Антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида подтверждена в иммунохимических реакциях (ИФА, Вестерн-блоттинг) с образцами сывороток крови больных гепатитом Е и контрольных групп пациентов. *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 3 генотипа и показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 46—53

Ключевые слова: вирус гепатита Е, ВГЕ 3 генотипа, ген orf3, рекомбинантный антиген ORF3, иммуноферментный анализ, ИФА, Вестерн-блоттинг

*G.I.Alatortseva¹, A.V.Sidorov¹, L.N.Nesterenko¹, L.N.Luhverchik¹, A.V.Milovanova¹,
Yu.I.Ammur¹, M.I.Mikhailov^{1,2}, K.K.Kyuregyan^{1,2}, S.V.Zhavoronok³, V.V.Zverev¹*

OBTAINING THE RECOMBINANT ORF3 PROTEIN OF HEPATITIS E GENOTYPE 3 AND EVALUATION OF ITS ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. Design and construction of the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 full-size ORF3 recombinant polypeptide. *Materials and methods.* Escherichia coli strains, plasmid vectors, serological

and biological amples, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* RNA was isolated from pig fecal extracts collected on Belgorod farms and was used in RT-PCR to obtain the fragment of the orf3 gene of the hepatitis E virus genotype 3. Using A/T-cloning a recombinant plasmid was obtained with insertion of a DNA fragment (230 bp) encoding the N-terminal region of the ORF3 protein. The primary structure of the missing C-terminal region of the ORF3 VGE of the genotype 3 was calculated by bioinformatics methods. Codon optimization of the sequence for biosynthesis in *E.coli* cells was performed. For constructing the recombinant plasmid a chemically synthesized DNA fragment encoding the full-length ORF3 protein had been used. *E.coli* strain producing full-size recombinant protein ORF3 fused to *E.coli* beta-galactosidase was developed. Recombinant protein ORF3 had been isolated from the inclusion bodies of the *E.coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of recombinant polypeptide had been confirmed in immunochemical reactions (ELISA, Western blot) with sera from patients with hepatitis E and control groups of patients. *Conclusion.* HEV genotype 3 ORF3 recombinant antigen had been designed, and its applicability in diagnostic tests had been experimentally confirmed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 46—53

Key words: hepatitis E virus; genotype 3 HEV; orf3 gene; recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blot

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) — острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, которое характеризуется преимущественно водным путем распространения, острым течением и частым развитием тяжелых форм у беременных. Подтверждением случая ГЕ считается обнаружение РНК вируса гепатита Е (ВГЕ) в фекалиях и/или сыворотке крови, наличие специфических IgM и/или IgG к ВГЕ с увеличением титра в 4 и более раза в парных сыворотках крови, взятых с интервалом в 4-6 недель в сочетании с клиническими и биохимическими проявлениями острого гепатита. В ряде случаев клинические проявления могут быть стертыми или отсутствовать.

Вирусный геном представлен одноцепочечной полиаденилированной РНК положительной полярности размером 7,3 т.н., содержит три открытые рамки считывания orf1, orf2 и orf3. Одним из важных этапов жизненного цикла вируса является образование бицистронной субгеномной РНК размером 2,2 т.н. с последующей транскрипцией информационной РНК, с которой транслируются наиболее антигенно-значимые белки ORF2 и ORF3 [11, 20]. Продукт гена orf3 — белок ORF3, или VP13 (m.w. 3 kDa) — включает 3 антигенные домена (в положениях с 31 по 40 а.о., с 63 по 76 а.о. и С-концевого участка) [13, 19]. Диагностически важная особенность белка ORF3 — его способность взаимодействовать со специфическими сыворотками крови больных на поздних сроках острой фазы инфекции и в ранней фазе реконвалесценции [16]. Стратегия получения рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 для применения в диагностических тестах представляется наиболее целесообразной, учитывая относительно его небольшой размер и возможность презентации всех эпитопов, необходимых для определения давности инфицирования и стадии развития заболевания.

Генотипирование изолятов ВГЕ показало, что в России и на территории постсоветского пространства циркулируют штаммы ВГЕ преимущественно 3 и 1 генотипов. Поскольку известно, что для белков ВГЕ разных генотипов характерны отличия в антигенных свойствах, была поставлена задача получения рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 1 и 3 генотипов путем клонирования в бактериальной экспрессирующей системе соответствующих фрагментов вирусного генома. Получение рекомбинантных полипептидов, содержащих антигенно-значимые фрагменты белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 1 генотипа, описано в ранее опубликованных работах [4, 5].

В данной работе была поставлена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 циркулирующего на территории России штамма ВГЕ 3 генотипа и оценка его антигенных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для проведения ПЦР и секвенирования синтезировали в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология». Получение фекальных экстрактов, выделение из них нуклеиновых кислот и подтверждение наличия РНК ВГЕ методом вложенной ПЦР проводили по ранее разработанным методикам [8]. Тотальную РНК выделяли из фекальных экстрактов с применением наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit («Qiagen», Германия) и High Pure RNA Isolation Kit («Roche Diagnostics», Германия). Дополнительно наличие РНК ВГЕ 3 генотипа в образцах тотальной РНК подтверждали методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров, Taq-полимеразы и красителя SybrGreen («Синтол», Россия). ДНК-копии полиаденилированной РНК получали с использованием праймеров dT-18 и обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США). Полученные ДНК-копии амплифицировали с помощью высокоточной ДНК-полимеразы «Phusion» («Finnzymes», Финляндия) и вирусоспецифических праймеров. Реакции проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biometra», Германия). ПЦР-продукты необходимого размера выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, для добавления к ПЦР-продукту эктра-3'-dA проводили ещё один цикл амплификации с Taq-полимеразой, полученную ДНК очищали на колонках («Евроген», Россия) и использовали в А/Т-клонировании. Лигирование полученных фрагментов ДНК в плазмидные векторы pGEM-Teasy («Promega», США), pAL2-T («Евроген», Россия), pEL5a [1] и трансформацию компетентных клеток *E.coli* CC001 генотипа XL-Blue (ООО «Евроген», Россия) и штамма *E.coli* PLT90 [2] лигазной смесью осуществляли по общепринятому методу Маниатис Т. и др.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом Сэнгера в модификации капиллярного электрофореза в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология» на геномном анализаторе «ABI-3130-XL» («Applied Biosystems», США). Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакет программ Vector NTI ver. 11.0. Полипептидные последовательности анализировали дополнительно, используя программу BLAST-Protein. Анализ коротких пептидных гомологий между белком ORF3 ВГЕ 3 генотипа и белками герпес-вирусов человека 1-8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [9, 15].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили с помощью ранее опубликованных методик [3, 7].

В работе использовали сыворотки крови больных ГЕ, предоставленные Белорусским государственным медицинским университетом. В качестве источника вирусной РНК использовали образцы фекалий свиней из свиноводческих хозяйств Белгородской обл. Сыворотки крови условно здоровых лиц и контрольной группы (содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и инфекционных патологий печени иной этиологии: инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция) были получены из Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф.Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И.Мечникова (Москва). В качестве положительного контрольного образца в иммунохимических реакциях использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ 1 генотипа [4], в качестве отрицательного — β-галактозидазу *E.coli*, выделенную из клеток штамма PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ», «ДС-ИФА-НВsAg-подтверждающий тест», «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ Скрин» (НПО «Диагностические системы»), «Вектогеп В-НВs-антиген-2», «ГепаБест анти-НВс-IgG», «Бест анти-ВГС-авто», «Бест анти-

ВГС-подтверждающий тест», «ВектоЦМВ-IgG-авидность», «ВектоВЭБ-ЕА-IgG», «ВектоВЭБ-НА-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»), «БЛОТ ВИЧ S+0» (ЗАО БТК «Биосервис»).

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве источника вирусосодержащего материала использовали образцы фекалий от свиней из Белгородской области — региона с высоким распространением ВГЕ среди людей и животных [6]. Из образцов фекальных экстрактов, по результатам ПЦР в реальном времени содержащих РНК ВГЕ 3 генотипа, выделяли тотальную РНК, которую использовали для получения кДНК в реакциях обратной транскрипции с применением праймеров dT-18, принимая во внимание факт 3'-концевого полиаденилирования вирионной РНК ВГЕ. С учетом высокой гетерогенности вирусного генома было проведено конструирование более 20 прямых и обратных праймеров различной степени вырожденности для получения ПЦР-продуктов разной длины. Условия реакции амплификации подбирали в зависимости от размера получаемого продукта, варьируя как состав и концентрацию компонентов реакции, так и условия ее проведения (время элонгации, градиент температуры отжига и т.д.). Критерием отбора ПЦР-продуктов для клонирования был их размер в диапазоне 230–2000 п.н.о. в зависимости от использованных для амплификации праймеров (рис. 1). Отдельные полосы, содержащие полученные ПЦР-продукты разных размеров, вырезали из агарозных гелей, ДНК очищали на колонках и клонировали в векторах pGEM-Teasy или pAL2-T. Полученные рекомбинантные плазмиды исследовали с помощью рестрикционного анализа с последующим секвенированием каждой из вставок ДНК, предположительно содержащих вирусоспецифические последовательности. В результате отбора были получены плазмиды, содержащие ПЦР-продукты размером 230 п.н.о., кодирующие N-концевые фрагменты вирусных белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 3 генотипа. ПЦР-продукт, содержащий ДНК-копию фрагмента генома ВГЕ 3 генотипа, был получен при использовании следующих праймеров: 5'-ATYGCCCATGGGATCRCCA-3' (прямой), 5'-TCCAGCCCCGGRTTGTGAWA-3' (обратный).

Последовательность клонированного фрагмента кодировала значительную часть (Met1-Leu76) белка ORF3. Анализ нуклеотидной последовательности 3'-концевого фрагмента гена *orf3* протяженностью 111 н.о. показал выраженную гетерогенность, однако кодируемый им С-концевой участок белка ORF3 оказался довольно консервативным, поэтому на основе множественного сравнения доступных в базах данных ами-

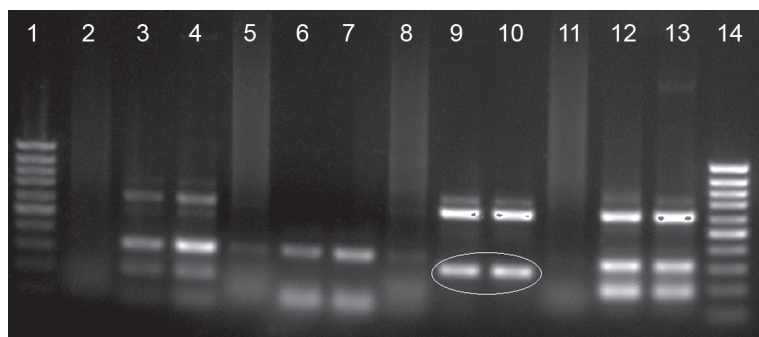


Рис. 1. Разделение ПЦР-продуктов с помощью электрофореза на 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Дорожки: 1, 14 — маркеры молекулярных масс ДНК 100 bp (сверху вниз: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 2, 5, 8, 11 — отрицательный контроль без добавления ДНК; 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13 — продукты ПЦР. На дорожках 9 и 10 отмечены ПЦР-продукты, содержащие фрагменты ДНК-копии геномной РНК ВГЕ.

нокислотных последовательностей была рассчитана консенсусная последовательность недостающего С-концевого фрагмента ORF3 (Glu77-Arg113): ELALDSRPAPSAPLGLTSPSAPPLPPVVDLPQLGLRR. Для улучшения экспрессии рекомбинантного белка в бактериальной системе дополнительно была проведена оптимизация кодонов. Синтез оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерный белок ORF3 ВГЕ 3 генотипа, был выполнен компанией «Евроген», затем синтетический ген *orf3* амплифицировали с использованием праймеров, фланкированных сайтами рестрикции *Xma*I и *Pst*I. ПЦП-продукт был вставлен в плазмиду pEL5a по соответствующим сайтам.

Анализ коротких гомологичных пептидных последовательностей между белком ORF3 ВГЕ 3 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1-8 типов подтвердил отсутствие заметной гомологии с белками цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна-Барр (ЭБВ). Ранее мы отмечали мотив QPTSPSP (63-69 а.о.) в белке ORF3 1 генотипа, совпадающий с мотивом в ядерном белке EBNA-2 ЭБВ [4]. В составе белка ORF3 3 генотипа мы обнаружили похожий мотив с консервативной для ВГЕ 3 генотипа аминокислотной заменой Ser на Leu в положении 67, приводящей к изменению структуры потенциального линейного эпитопа. По литературным данным иммунодоминантный домен ORF3 1 генотипа локализован в области 67-76 а.о. [13, 19], нами показано практическое отсутствие совпадения в структуре данного эпитопа у белков ORF3 1 и 3 генотипов (LPP в белке ORF3 ВГЕ 3 генотипа вместо SPP в белке ORF3 ВГЕ 1 генотипа).

Таким образом, была получена плаزمида, кодирующая полноразмерную копию белка ORF3 в виде слитного с β -галактозидазой *E.coli* полипептида. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка было подтверждено секвенированием. Белковый состав лизатов клонов рекомбинантного штамма-производителя, полученного в результате трансформации рекомбинантной плазмидой клеток штамма *E.coli* PLT90, исследовали методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и Вестерн-блоттинга с пулом

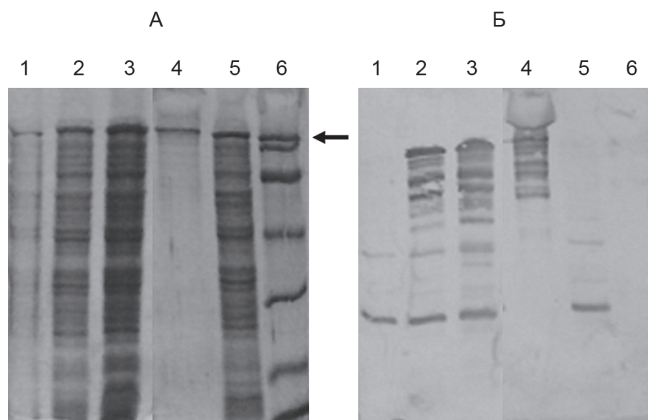


Рис. 2. Анализ с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле (А) и Вестерн-блоттинга с пулом сывороток крови больных ГЕ (Б) белковых профилей бактериальных клонов после трансформации рекомбинантной плазмидой, содержащей ДНК-копию гена *orf3* ВГЕ 3 генотипа.

Дорожки: 1, 5 — лизаты биомасс клеток *E.coli* PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК; 2, 3 — образцы лизатов биомасс клонов *E.coli* PLT90, трансформированных рекомбинантной плазмидой со вставкой ДНК-копии гена *orf3* ВГЕ 3 генотипа; 4 — рекомбинантный белок ORF3 ВГЕ 1 генотипа [4]; 6 — маркеры молекулярных масс (193, 112, 64, 30, 26, 12,8; 6,5 кД). Стрелкой показано положение β -галактозидазы *E.coli*.

образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ (рис. 2). По результатам исследований отобрали клон, для которого был показан наибольший уровень синтеза рекомбинантного белка, обладающего антигенной активностью в реакции иммуноблоттинга со специфическими сыворотками.

Степень очистки рекомбинантного антигена ORF3 и β -галактозидазы *E.coli* на отдельных стадиях процесса выделения контролировали с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Исследование фракций белка после хроматографической очистки подтвердило отделение рекомбинантных полипептидов от основной массы примесных белков. Белковые фракции тестировали также методом ИФА в реакциях с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ, и с пулом отрицательных сывороток. Фракции, содержащие наибольшее коли-

чество целевого белка и наименьшее примесей, а также показавшие наилучшую реактивность в ИФА с положительной сывороткой и минимальные неспецифические взаимодействия с отрицательной, объединяли, полученный препарат белка дополнительно исследовали методом электрофореза в SDS-полиакриламидном геле. Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по результатам электрофоретического профиля лизатов штамма-продуцента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, соответствовала расчетной величине (128,4 кДа). Продуктивность полученного рекомбинантного штамма составила не менее 2,5 мг рекомбинантного белка на 1 г биомассы, степень очистки белка по данным электрофореза 100%.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих тест-систем на содержание серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВПГ1, ВПГ2, ЦМВ. Средние значения оптической плотности (ОП) в обследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена полученного рекомбинантного белка ORF3 представлены в табл.

При взаимодействии с полученным белком ORF3 3 генотипа 48 из 50 образцов (96 %) от больных ГЕ и реконвалесцентов были позитивными с ОП от 0,236 до 0,657 о.е./мл. Более редкое выявление антител к ВГЕ и относительно невысокие значения ОП можно объяснить, во-первых, меньшим количеством диагностически значимых эпитопов в его составе по сравнению с ORF2, используемом в качестве антигенной основы в наборе реагентов для отбора образцов сывороток [17], и, во-вторых, тем, что белки ORF3 ВГЕ индуцируют образование преимущественно специфических IgM и ранних IgG [16], а данное исследование проводилось на охарактеризованных только в отношении IgG образцах, полученных как от больных, так и от реконвалесцентов.

Ложноположительных реакций с исследованными образцами от здоровых доноров не обнаружено. Результаты тестирования образцов контрольных групп (пациенты с вирусными гепатитами А, В и С, ВИЧ-инфицированные лица, больные цитомегаловирусной инфекцией и герпесвирусными инфекциями, вызванными ВПГ первого и второго типов) показали отсутствие позитивных реакций с полученным рекомбинантным белком, что позволяет сделать заключение о его высокой антигенной специфичности. При использовании в качестве антигена препарата β -галактозидазы, выделенной из биомассы клеток штамма *E.coli* PLT90, трансформированных плазмидой rEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК, положительных реакций с образцами сывороток опытной и контрольных групп не выявлено.

Сравнительные анализ результатов ИФА, полученных с использованием нашего рекомбинантного белка и референс-набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», Е-151, НПО «Диагностические системы» (ОПкр. = 0,195) показал полное совпадение: среди обследованных больных ГЕ

и реконвалесцентов не выявлено ложноотрицательных образцов, среди обследованных здоровых доноров и контрольных групп — ложноположительных образцов.

На территории России и большинства других стран наиболее распространен ВГЕ 3 генотипа, что объясняет использование в производимых в России и за рубежом тест-системах для серодиагностики ГЕ в качестве антигенной

Результаты иммуноферментной оценки полученного рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 3 генотипа

Обследуемая группа	Количество исследованных образцов	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП сред. ($M \pm m$)		
		ORF3 ВГЕ 3 генотипа	β -галактозидаза <i>E.coli</i>	Референс-набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», Е-151 ОП _{кр.} = 0,195
Больные ГЕ и реконвалесценты	50	0,407 \pm 0,030	0,024 \pm 0,002	0,832 \pm 0,09
Здоровые доноры	75	0,047 \pm 0,006	0,022 \pm 0,002	0,029 \pm 0,005
Больные ВГА	20	0,084 \pm 0,001	0,025 \pm 0,002	0,038 \pm 0,006
Больные ВГВ	20	0,026 \pm 0,002	0,027 \pm 0,001	0,027 \pm 0,004
Больные ВГС	20	0,025 \pm 0,004	0,024 \pm 0,002	0,031 \pm 0,005
ВИЧ-инфицированные	20	0,079 \pm 0,005	0,024 \pm 0,001	0,046 \pm 0,008
Больные ВПГ-1,2	20	0,091 \pm 0,006	0,026 \pm 0,002	0,026 \pm 0,010
Больные ЦМВ	20	0,033 \pm 0,006	0,025 \pm 0,003	0,034 \pm 0,007

основы рекомбинантных полипептидов, содержащих фрагменты белка ORF3 ВГЕ 3 генотипа различной длины. Небольшой размер белка ORF3, отсутствие значимых аминокислотных гомологий с белками других вирусов, наличие антигенных сайтов на всем протяжении белка определили задачу данного исследования: получение рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 ВГЕ 3 генотипа. Предполагаемое рядом авторов конформационное экранирование эпитопов в составе рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 [14] с большой вероятностью не имеет места в случае полученного нами белка, поскольку методика его очистки из нерастворимых телец включений содержит этап денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена, затрагивающая иммунодоминантный домен, что может приводить к штаммоспецифичной вариабельности антигенных свойств ВГЕ и свидетельствовать об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса. Поскольку в научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [10, 12], проведено сравнение аминокислотных последовательностей разработанного нами антигена и белков герпесвирусов, показавшее отсутствие протяженных гомологичных участков. Методами иммуноблоттинга и ИФА в реакциях с сыворотками крови больных ГЕ и групп сравнения, включающими образцы с серологическими маркерами инфицирования ЦМВ и ВЭБ, показана антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида. Однако для более надежного обоснования возможности применения в диагностических тестах требуется дополнительное расширенное и более детальное исследование его иммунореактивных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
2. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2071501 на изобретение «Вектор рEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
3. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина Е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15, 1(86): 77-85.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 1 генотипа с применением метода оптимизации кодонов. Журн. микробиол. 2017, 6: 63-72.
5. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е 1: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. Журн. микробиол. 2017, 6: 72-80.
6. Поляков А.Д. Особенности эпидемиологического процесса гепатита Е в Белгородской области. Научные ведомости. Сер. Медицина. Фармация, 2016, 5(226), вып. 33:79-83.
7. Практическая химия белка. Ред. Дарбре А. М., 1989.
8. Солонин С.А., Мальцева Н.С., Троценко О.Е. и др. Циркуляция вируса гепатита Е на территории Хабаровского края. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010, 16: 31-36.
9. Altschul S., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search too. *J. Molecular. Biology.* 1990, 215(3):403-410.
10. Fogeda M., de Ory F., Avellyn A. et al. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 2009, 45(3): 259-261.
11. Graff J., Torian U. et al. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006, 80: 5919-5926.
12. Nyams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 2014, 86(3): 478-483.

13. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A. et al. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology*. 1993, 194(1): 89-96.
14. Khudyakov Y. E., Khudyakova N.S, Jue D.L. et al. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 1994, 75 (3): 641-646.
15. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992, 89(17): 8259-8263.
16. Ma H., Song X., Li Z. et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009, 81(6): 1052-1061.
17. Obriadina A., Meng J.H., Ulanova T. et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2002, Suppl 3:360-364.
18. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979, 76(9):4350-4359.
19. Yarbough P.O., Tam A.W., Fry K.E. et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 1991, 659(11): 5790-5797.
20. Zhou Y.H., Purcell R.H., Emerson S.U. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine*. 2004, 22(20): 2578-2585.

Поступила 11.04.18

Контактная информация: Алаторцева Галина Ивановна, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*С.А.Мазурина¹, Г.А.Данилина², М.Ю.Смирнова³, Г.Л.Осипова³, В.Б.Гервазиева¹,
А.Ю.Конищева¹, Т.П.Оспельникова^{1,2}*

МИКРОБИОТА НИЖНИХ ОТДЕЛОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии Н.Ф.Гамалеи, ³НИИ пульмонологии, Москва

Цель. Определить композиционный состав микробиоты и частоту выявления отдельных бактериальных видов в образцах мокроты у пациентов с бронхиальной астмой (БА), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и их сочетанной формой. *Материалы и методы.* Проведено бактериологическое исследование образцов индуцированной мокроты больных хроническими обструктивными заболеваниями легких (БА, ХОБЛ). *Результаты.* У больных сочетанной формой БА и ХОБЛ обнаружен более разнообразный видовой состав *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp., грамотрицательные палочки *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, грамположительные палочки и палочковидные бактерии *Corynebacterium* spp., *Actinomycetes* spp. и *Tsukamurella paurometabola* в сравнении с пациентами, страдающими только астмой или ХОБЛ. Отмечено изменение микробного состава (преобладание *Streptococcus* spp., *Neisseria subflava* и снижение *Enterococcus* spp.) у пациентов с ХОБЛ и сочетанной формой ХОБЛ и БА, осложненных дыхательной недостаточностью, эмфиземой легких и/или диффузным пневмосклерозом. *Заключение.* Видовое разнообразие респираторной микробиоты является не только фактором риска прогрессирующего течения легочных заболеваний, но и свидетельствует о тех изменениях в структуре ткани легкого, которые происходят в процессе хронического воспаления.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 53—60

Ключевые слова: бронхиальная астма, ХОБЛ, сочетанная форма БА/ХОБЛ, респираторный микробиом