

Е. В. Отрашевская<sup>1</sup>, Е. К. Букин<sup>2</sup>, А. В. Отрашевская<sup>3</sup>, Г. М. Игнатьев<sup>4</sup>

## Сравнительная оценка иммуноферментных тест-систем для определения антител класса G к вирусу эпидемического паротита

<sup>1</sup>ФГУП НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, Москва; <sup>2</sup>Новосибирский областной центр по борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями; <sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск; <sup>4</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск

Проведено исследование сывороток 70 здоровых добровольцев на наличие специфических IgG с помощью двух коммерческих ИФА-тест-систем “Enzygnost Anti-Parotitis Virus ELIA/IgG” (Германия) и “Паротит-скрин” (Россия) и реакции нейтрализации (РН) со штаммами вируса паротита (ВП) Enders и Ленинград-3 (Л-3). Количество положительных результатов в системе “Паротит-Скрин” (80%) значительно превзошло количество положительных результатов в системе “Enzygnost” (52,9%) ( $p < 0,05$ ). Процент совпадений результатов использования двух ИФА-тест-систем – 72,9 (50% положительных результатов и 22,9% отрицательных результатов). Совпадение результатов и их корреляция были значительно лучше в паре “Enzygnost”/РН со штаммом Enders (98,6%,  $r = 0,9$ ,  $p < 0,05$ ), чем в паре “Паротит-скрин”/РН со штаммом Л-3 (77,1%,  $r = 0,7$ ,  $p < 0,05$ ). Последнее свидетельствует о том, что система “Enzygnost” значительно специфичнее системы “Паротит-скрин”.

Ключевые слова: паротит, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации, оценка, корреляция

### Comparative Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to Mumps Virus

A. V. Atrasheuskaya<sup>1</sup>, E. K. Bukin<sup>2</sup>, Al. Atrasheuskaya<sup>3</sup>, and G. M. Ignatyev<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Novosibirsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Other Infectious Diseases, Novosibirsk, Russia; <sup>3</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus; <sup>4</sup> Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Two enzyme immunoassays (ELISA) for mumps antibody detection using the Enzygnost (Germany) and Parotit-screen (Russia) were comparatively assayed using sera of randomly assigned 70 healthy young adult volunteers. The neutralization test (NT) was performed for all sera using mumps viruses (MVs) of the relevant strains Enders and Leningrad-3. The proportion of positive results was significantly higher with the Parotit-screen than with the Enzygnost (80% versus 52.9%,  $p < 0.05$ ). The proportion of the concordant results in both ELISAs was as 72.9% (50% for positive results and 22.9% for negative results). There was significantly better agreement between the NT with MV strain Enders and Enzygnost (98.6%,  $r = 0.9$ ,  $p < 0.05$ ) than between the NT with MV strain Leningrad-3 and Parotit-screen (77.1%,  $r = 0.6$ ,  $p < 0.05$ ). It was concluded that the Enzygnost was apparently more specific than the Parotit-screen.

Key words: mumps, ELISA, NT, evaluation, correlation

Известно, что высокий уровень вакцинации населения и даже серопозитивности вакцинированных в принципе не исключает трансмиссию вируса паротита (ВП) в популяции и развитие вспышек паротитно-вирусной инфекции [4, 6, 18]. Очевидно, что определение только уровня серопозитивности вакцинированной популяции на данном этапе является недостаточным критерием для оценки протективности вакцинации. Самым распространенным методом оценки иммунного ответа организма на ВП является определение уровня специфических антител (IgG) в сыворотке крови посредством иммуноферментного анализа (ИФА). Общеизвестно, что ИФА-тест-системы, являясь более простыми, быстрыми и удобными в применении, в то же время менее специфичны, чем метод нейтрализации [5, 6, 8, 9, 18]. Использование в популяционных исследованиях разных ИФА-тест-систем, которые обладают разной чувствительностью и специфич-

ностью, приводит к некоторому искажению реального уровня популяционного иммунитета [3, 7, 17]. Результаты исследований иммунитета против ВП могут также различаться в зависимости от генотипа ВП, который используется в исследовании, а также от типа определяемых специфических IgG [3, 11, 14, 17]. ИФА-тест-системы позволяют измерить общий уровень специфических IgG, из которых лишь часть является функционально значимой и определяется в реакции нейтрализации (РН). Метод нейтрализации общепризнан как «золотой стандарт», будучи наиболее специфичным, чувствительным и точным, в то же время он является достаточно трудоемким и затратным по времени и ресурсам [5, 6, 9, 15].

Отсутствие стандартизации лабораторных исследований прежде всего в связи с тем, что нет международного стандарта, противопаротитной сыворотки, является существенной проблемой при оценке уров-

Контактная информация:

Отрашевская Елена Викторовна, нач. отд.; e-mail: e.v.otrashevskaya@microgen.ru

Результаты качественного анализа сывороток здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к ВП методами ИФА и РН

Метод исследования	Штамм ВП	Положительный результат	Отрицательный результат
ИФА-1	Enders, генотип А	37 (52,9%)	33 (47,1%)
ИФА-2	Ленинград-3	56 (80,0%)*	14 (20,0%)*
РН-1	Enders, генотип А	38 (54,3%)	32 (45,7%)
РН-2	Ленинград-3	46 (65,7%)	24 (34,3%)
РН-3	PetroNov, генотип Н	26 (37,1%)	44 (62,9%)
РН-4	Drag94, генотип С	31 (44,3%)	39 (55,7%)

Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

ня поствакцинального популяционного иммунитета [18], а также при определении минимальных протективных титров противопаротитных IgG [14–16].

Мы провели изучение сывороток здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к ВП с помощью двух коммерческих ИФА-тест-систем (российской и зарубежной), а также методом нейтрализации с 4 штаммами ВП – вакцинным штаммом Ленинград-3 (Л-3) и 3 “дикими” штаммами разных генотипов.

### Материалы и методы

Для участия в исследовании было отобрано 70 здоровых (без хронических заболеваний) мужчин в возрасте 20–25 лет без учета факта вакцинации против паротита и наличия паротитной инфекции в анамнезе. Все добровольцы дали письменное согласие на участие в исследовании.

Специфические IgG в сыворотке определяли одновременно в наборах “Enzygnost Anti-Parotitis Virus ELISA/IgG” компании “Dade Behring Inc.” (Германия) и “Паротит-скрин” ЗАО БК “Биосервис” (Россия) согласно инструкциям производителей. Данные тест-системы были выбраны потому, что система “Паротит-скрин” наиболее часто используется для популяционных исследований в России [1], а “Enzygnost” использовалась в качестве референс-системы при проведении широкомасштабных исследований (в 21 стране) по стандартизации серологических методов [17]. Результаты оценивали качественно как положительный или отрицательный. Сыворотки с неоднозначными результатами исследовали повторно.

Реакцию нейтрализации проводили с вакцинным штаммом Л-3 (GenBank JF 727651–JF727652) – РН 1 и штаммом Enders (генотип А) – РН 2. По данным производителей, именно эти штаммы ВП используются в ИФА-тест-системах “Enzygnost” и “Паротит-Скрин”. В исследовании также применяли дикие штаммы ВП – Drag94 (генотип С, GenBank AY669145) и PetroNov (генотип Н, GenBank AY681495), изолированные ранее на территории РФ [4]. РН выполняли по ранее описанной методике [4–6]. Отрицательный контроль (охарактеризованная неиммунная сыворотка) использовали в каждой РН. Титр 1:4 был принят как минимальный уровень серопозитивности в РН [5].

Каждый образец сыворотки исследовали трехкратно каждым методом. Статистическую достоверность определяли как  $p \leq 0,05$ . Для проверки взаимосвязи между показателями рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ), критерии Ньюмена-Кейлса и МакНимара [13].

### Результаты

Результаты исследования сывороток 70 здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к ВП представлены в табл. 1.

Результаты тестирования сывороток с помощью ИФА-тест-системы “Паротит-скрин” (ИФА-2) достоверно ( $p < 0,05$ ) отличались от результатов, полученных при тестировании с помощью тест-системы “Enzygnost” (ИФА-1), а также от результатов РН-2 ( $p < 0,05$ ). Результаты исследований в ИФА-1 и РН-1 были статистически сопоставимы ( $p > 0,05$ ).

Самый высокий процент положитель-

ных результатов в РН-2 среди 4 РН объясняется вакцинацией большинства добровольцев в детстве российской вакциной, содержащей штамм ВП Л-3.

Результаты попарного сравнения данных, полученных при тестировании сывороток методами ИФА и РН, представлены в табл. 2. При оценке частоты совпадений результатов выявлен самый высокий процент совпадений (98,6) и самый высокий коэффициент корреляции ( $r = 0,9$ ) между ИФА-1 и РН-1. Этот результат объясняется тем, что в ИФА-1 и РН-1 в качестве антигена использовали штамм ВП Enders. На этом фоне неожиданным оказался результат совпадений (77,1%) и коэффициент корреляции ( $r = 0,6$ ) между ИФА-2 и РН-2, несмотря на то что в качестве антигена в обоих исследованиях использовали штамм ВП Л-3.

Высокий процент совпадений результатов (82,9) и высокий коэффициент корреляции ( $r > 0,7$ ) между РН-1 и РН-2 в нашем исследовании был достаточно ожидаемым, так как ранее была отмечена высокая корреляция и минимальная разница между титрами нейтрализующих антител к штаммам Л-3 и Enders у привитых российской паротитной вакциной добровольцев [2, 4].

При попарном межгрупповом сравнении результатов с использованием критериев Ньюмена-Кейлса и МакНимара получено статистическое подтверждение достоверности совпадения результатов ИФА-1 и РН-1, а также РН-1 и РН-2 ( $p > 0,05$ ) и различия между результатами, полученными в ИФА-1 и ИФА-2 ( $p < 0,005$ ), а также в ИФА-2 и РН-2 ( $p < 0,022$ ).

При сравнении результатов тестирования сывороток здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к штаммам Л-3 и Enders с результатами РН-3 и

Результаты сравнения данных тестирования сывороток здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к ВП методами ИФА и РН и индекс корреляции ( $r$ ) результатов

Метод исследования	Совпадение положительных результатов	Совпадение отрицательных результатов	Общее количество совпадений	$r$	$p$
ИФА-1/РН-1	35 (50%)	34 (48,6%)	69 (98,6%)	0,9	< 0,001
ИФА-2/РН-2	42 (60,0%)	12 (17,1%)	54 (77,1%)	0,6	< 0,001
ИФА-1/ИФА-2	35 (50,0%)	16 (22,9%)	51 (72,9%)	0,5	< 0,001
РН-1/РН-2	34 (48,6%)	24 (34,3%)	58 (82,9%)	0,7	< 0,001
ИФА-1/РН-2	34 (48,6%)	24 (34,3%)	58 (82,9%)	0,7	< 0,001
ИФА-2/РН-1	36 (51,4%)	16 (22,9%)	52 (74,3%)	0,5	< 0,001

Результаты сравнительного тестирования сывороток здоровых добровольцев на наличие специфических IgG к ВП методом РН со штаммами ВП генотипов С и Н

Метод исследования	Совпадение положительных результатов		Совпадение отрицательных результатов		Общее количество совпадений	
	РН-3	РН-4	РН-3	РН-4	РН-3	РН-4
ИФА-1	27 (38,6%)	23 (32%)	31 (44,3%)	30 (42,9%)	58 (82,9%)	53 (75,7%)
ИФА-2	28 (40,0%)	24 (34,3%)	15 (21,4%)	16 (22,9%)	43 (61,4%)	40 (57,1%)
РН-1	28 (40,0%)	23 (32,9%)	30 (42,9%)	31 (44,3%)	58 (82,9%)	54 (77,1%)
РН-2	28 (40,0%)	24 (34,3%)	25 (35,7%)	24 (34,3%)	53 (75,7%)	48 (68,6%)

РН-4 (табл. 3) выявлено практически одинаковое количество совпадений положительных результатов. Самый низкий процент совпадений отрицательных результатов имела ИФА-2. Таким образом, в ИФА-2 вновь было получено самое большое количество положительных результатов. Опосредованно еще раз подтверждена разница между ИФА-2 и РН-2 относительно результатов РН-3 и РН-4. При этом общее количество совпадений результатов ИФА-1 и РН-1 с результатами РН-3 и РН-4 практически одинаково (см. табл. 3).

Следует отметить, что воспроизводимость результатов в обеих ИФА-тест-системах (тремя исследованиями всех сывороток) была практически одинаковой – 94% для ИФА-2 и 96% для ИФА-1.

### Обсуждение

При проведении «слепого» исследования сывороток 70 здоровых добровольцев на наличие специфических антител к ВП тест-система «Паротит-Скрин» дала значительно больше положительных результатов, чем «Enzygnost». При этом корреляция результатов между ИФА-методом и методом нейтрализации в паре «Паротит-скрин»/РН с ВП Л-3 ( $r = 0,6$ ) была значительно ниже, чем в паре «Enzygnost»/РН с ВП Enders ( $r > 0,9$ ). Учитывая более высокую специфичность и чувствительность РН [5, 6, 9, 15] в сравнении с ИФА, можно сделать заключение об относительно высокой специфичности ИФА-тест-системы «Enzygnost» (98,6%) и относительно низкой специфичности «Паротит-скрин» (77,1%). В нашем исследовании использовались гомологичные штаммы ВП в ИФА и РН, поэтому его можно оценить как релевантное.

При проведении популяционных серологических исследований всегда возникает вопрос, насколько серопозитивный статус вакцинированных коррелирует с уровнем защиты от ВП. По мнению некоторых исследователей, серологическое исследование специфических IgG в ИФА-тест-системах с большой степенью вероятности дает завышенную оценку протективности многих вакцин против ВП [10]. Проблемы лабораторной оценки протективности поствакцинального иммунитета периодически обсуждаются [3, 4, 14]. Прежде всего отмечается недостаточная корреляция между используемыми ИФА-тест-системами и «золотым стандартом» РН, что особенно влияет на информативность исследований популяционного иммунитета против ВП [4, 7, 14, 17]. Следует отметить, что на данном этапе сам «золотой стандарт» РН не имеет стандартного протокола [2, 4–6, 15, 18]. Также нет международных стандартных противопаротитных референс-сывороток.

Широкомасштабные серологические исследования по кори, паротиту и краснухе, проведенные в 21 стране с использованием 16 разных ИФА-тест-систем, показали, что именно для ВП характерно наличие ложноположительных результатов [17]. Данный факт частично объясняется кросс-

реактивностью между ВП и другими парамиксовирусами в системе ИФА, в частности вирусом парагриппа [17]. На результат исследований также влияет штамм ВП, используемый в ИФА-тест-системе. Было отмечено, что применение гетерологичных штаммов ВП ставит под сомнение релевантность сравнительных исследований сывороток методами ИФА и РН [12, 14, 17].

Функционально значимыми являются только антитела, обладающие нейтрализующей активностью [4–6, 14, 15, 17]. Ранее были показаны отсутствие корреляции между серологическими титрами специфических IgG и титрами нейтрализующих IgG [2], а также возможность отсутствия нейтрализующих антител при наличии высоких серологических титров противопаротитных IgG [3, 5, 6, 13]. Данный феномен в значительной степени объясняется использованием разных (гетерологичных) штаммов ВП в ИФА и РН [2, 4–6, 12, 14, 15, 17].

По нашему мнению, для серологической оценки иммуногенности вакцины ИФА-тест-система, должна содержать в качестве антигена штамм ВП, идентичный вакцинному штамму. ИФА-тест-система должна быть также откалибрована относительно «золотого стандарта» – РН с тем же штаммом ВП. Первое условие было соблюдено в ИФА-тест-системе «Паротит-скрин», в которой используется штамм ВП Л-3. Калибровка относительно РН с гомологичным штаммом ВП, судя по корреляции и количеству совпадений результатов в наших исследованиях, не была выполнена для ИФА-тест-системы «Паротит-скрин».

В заключение необходимо отметить следующее. Чтобы по титрам специфических IgG можно было судить о протективности иммунитета, необходимо не только использовать ИФА-тест-систему, произведенную на основе вакцинного или гомологичного ему штамма ВП и коррелирующую с показателями РН с тем же штаммом ВП, но и знать спектр нейтрализующей активности и уровень кросс-реактивности специфических поствакцинальных IgG [2, 16] относительно циркулирующих «диких» штаммов ВП. Такое исследование ранее было проведено для российского вакцинного штамма Л-3 [2] и частично для штамма Jeryl Lynn [16].

Создание стандарта противопаротитной сыворотки, стандартизация протокола РН и калибровка ИФА-тест-систем относительно стандартной РН с вакцинным штаммом ВП сделают все популяционные исследования сопоставимыми, а оценку эффективности вакцинации против паротита более достоверной.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Михеева И. В., Лыткина И. Н. Эпидемиология и вакцинопрофилактика эпидемического паротита // *Вакцинация*. – 2003. – № 1. – С. 5–6.
2. Отрашевская Е. В., Букин Е. К., Красильников И. В., Игнатьев Г. М. Состояние специфического гуморального иммунитета после однократной иммунизации паротитной вакциной: данные трехлетнего наблюдения // *Вопр. вирусол.* – 2011. – № 3. – С. 22–25.
3. Allwinn R., Zeidler B., Steinhagen K. E. et al. Assessment of mumps virus-specific antibodies by different serological assays: which test correlates best with mumps immunity // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 30. – N 10. – P. 1223–1228.
4. Atrasheuskaya A. V., Neverov A. A., Rubin A. V., Ignatyev G. M. Horizontal transmission of the L-3 live attenuated mumps vaccine virus // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – P. 1530–1536.
5. Atrasheuskaya A. V., Blatun E. M., Kulak M. V. et al. Investigation of mumps vaccine failures in Minsk, Belarus // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – P. 4651–4658.
6. Atrasheuskaya A. V., Kulak M. V., Rubin S., Ignatyev G. M. Mumps vaccine failure investigation in Novosibirsk, Russia, 2002–2004 // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2007. – Vol. 7. – P. 670–676.
7. Backhouse J. L., Gidding H. F., McIntyre P. B., Gilbert G. L. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G antibodies to mumps virus // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 764–767.
8. Cristenson B., Böttiger M. Methods for screening the naturally acquired and vaccine-induced immunity to the mumps virus // *Biogicals.* – 1990. – Vol. 18. – P. 213–219.
9. Dayan G. H., Rubin S. Mumps outbreaks in vaccinated populations; are available mumps vaccine effective enough to prevent outbreaks? // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 47. – P. 1458–1467.
10. Hanna-Wakima R., Yasukawa L. L., Sung P. et al. Immune responses to mumps vaccine in adults who were vaccinated in childhood // *J. Infect. Dis.* – 2008. N 12. – P. 1669–1675.
11. Mossong J., Putz L., Schneider F. Seroprevalence of measles, mumps and rubella antibodies in Luxembourg: results from a national cross-sectional study // *Epidemiol. Infect.* – 2003. – Vol. 132. – P. 11–18.
12. Munsen Kh., Aboudy Y., Mendelson E., Green M. S., Cohen D. Prevalence of mumps antibodies in the Israeli population in relation to mumps vaccination policy and incidence of disease // *Epidemiol. Infect.* – 2008. – Vol. 136. – P. 688–693.
13. Norman G. R., Streiner D. L. *Biostatistics. The bare essentials.* – 2nd Ed. – London, 2000.
14. Pipkin P. A., Afzal M. A., Heath A. B. et al. Assay of humoral immunity to mumps virus // *J. Virol. Meth.* – 1999. – Vol. 79. – P. 219–225.
15. Rubin S., Mauldin J., Chumakov K. et al. Serological and phylogenetic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – P. 2662–2668.
16. Rubin S. A., Qi L., Audet S. A. et al. Antibody induced by immunization with the Jeryl Lynn mumps vaccine strain effectively neutralizes a heterologous wild-type mumps virus associated with a large outbreak // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 198. – N 4. – P. 508–515.
17. Tisher A., Andrews N., Kafatos G. et al. Standardization of measles, mumps and rubella assays to enable comparisons of seroprevalence data across 21 European countries and Australia // *Epidemiol. Infect.* – 2007. – Vol. 135. – P. 787–797.
18. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases // *Vaccines and Biologicals.* – 2003. – Vol. 1. – P. 18–21.

Поступила 11.11.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 578.833.2/3:578.11.083.2

*А. С. Владыко, Е. П. Счесленок, Е. Г. Фомина, П. А. Семижон, Г. М. Игнатьев, Т. В. Школина, А. Г. Красько, С. Ф. Семенов, Н. В. Винокурова*

## Получение и антигенная характеристика рекомбинантных нуклеокапсидных белков вирусов Ласса и Марбург

ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск

Созданы векторные конструкции, позволяющие экспрессировать рекомбинантные полипептиды вирусов Ласса и Марбург в прокариотических клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3). Полученные рекомбинантные полипептиды способны связывать специфические антитела, что позволяет использовать их в качестве антигенных компонентов иммуноферментных диагностических тест-систем.

Ключевые слова: *геморрагические лихорадки, вирус Ласса, вирус Марбург, рекомбинантные полипептиды*

### Detection and Antigenic Characteristics of the Recombinant Nucleocapsid Proteins of Lassa and Marburg Viruses

*A. S. Vladyko, E. P. Scheslenok, E. G. Fomina, P. A. Semizhon, G. M. Ignatyev, T. V. Shkolina, A. G. Krasko, S. F. Semenov, and N. V. Vinokurova*

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Two plasmid vectors, which allow the recombinant polypeptides of Lassa and Marburg viruses to be expressed in prokaryotic cells *E. coli* strain BL21 (DE3), were produced. The two recombinant polypeptides are able to bind specific antibodies. This provides an opportunity to use them as antigenic components of immunoassay diagnostic test kits.

Key words: *hemorrhagic fever, Lassa virus, Marburg virus, recombinant polypeptides*

Вирус Марбург относится к семейству филовирусов и вызывает у людей в эндемичных регионах опасную одноименную геморрагическую лихорадку с летальностью 23–90% [7]. До настоящего времени природные очаги и резервуар лихорадки Марбург окончательно не выяснены. Ежегодные вспышки этой лихорадки отмечены в странах

Центральной Африки. Вирус Ласса является представителем особо опасной группы из семейства аренавирусов. Вызывает летальность в природных очагах, локализованных в странах центральной части Западной Африки, в пределах 5–20% [3, 5, 6]. В других странах практически ежегодно отмечаются случаи заноса этих инфекций. По-

Контактная информация:

Владыко Александр Станиславович, д-р мед. наук, проф., рук. лаб.; e-mail: vladyko@belriem.by