

REFERENCES

- Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 1188–93.
- Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.* 1998; 37: 83–95.
- Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *MMWR Recomm. Rep.* 2011; 60(1): 1–24.
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009; 82: 95–102.
- Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 155–62.
- Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* 2013; 98: 174–85.
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P. et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 16–32.
- Kumar A., Zarychanski R., Pinto R. et al. Critically ill patients with 2009 influenza A (H1N1) infection in Canada. *JAMA.* 2009; 302: 1872.
- Perrone L.A., Plowden J.K., Garcia-Sastre A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000115. doi: 10.1371/journal.ppat.1000115
- Aoki F.Y., Macleod M.D., Paggiaro P. et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51(1): 123–9.
- Kandun I.N., Tresnaningsih E., Purba W.H. et al. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet.* 2008; 372(9640): 744–9.
- Darwish I., Mubareka S., Liles W.C. Immunomodulatory therapy for severe influenza. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(7): 807–22.
- Schröfelbauer B., Raffetseder J., Hauner M. et al. Glycyrrhizin, the main active compound in licorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling. *Biochem. J.* 2009; 421: 473–82.
- Tuvim M.J., Gilbert B.E., Dickey B.F., Evans S.E. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One.* 2012; 7(1): e30596. doi: 10.1371/journal.pone.0030596.
- Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem. J.* 2005; 392: 191–9.
- Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R.B., Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(3): 551–6.
- Michaelis M., Geiler J., Nacz P. et al. Glycyrrhizin inhibits highly pathogenic H5N1 influenza A virus-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010; 199 (4): 291–7.
- Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Anfimov P.M., Shtro A.A. Effect of a combination of glutamyl-tryptophan and glycyrrhizic acid on the course of acute infection caused by influenza (H3N2) virus in mice. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(3): 23–7. (in Russian)
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
- Alterovitz G., Tuthill C., Rios I., Modelska K., Sonis S. Personalized medicine for mucositis: Bayesian networks identify unique gene clusters which predict the response to gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07) for the attenuation of chemoradiation-induced oral mucositis. *Oral Oncol.* 2011; 47(10): 951–5.
- Rose W.A. 2nd, Tuthill C., Pyles R.B. An immunomodulating dipeptide, SCV-07, is a potential therapeutic for recurrent genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32: 262–6.
- Smirnov V.S., Selivanov A.A. *Bioregulators in prophylaxis and treatment of influenza.* Sankt-Petersburg: Nauka; 1996. 69 p. (in Russian)
- Smirnov V.S. *Prophylaxis and treatment of influenza and acute respiratory viral infections.* Sankt-Petersburg: AYSING; 2010. (in Russian)

Received 16.09.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 578.833.26.083.2

Белова О.А.^{1,2}, Буренкова Л.А.¹, Карань Л.С.³, Колясникова Н.М.^{1,3}, Топычканова Н.Г.⁴, Кувшинова И.Н.⁴, Тимофеев Д.И.⁴, Рукавишников М.Ю.⁴, Гришаев М.П.⁴, Карганова Г.Г.^{1,2}

Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени

¹ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, 142782, г. Москва; ²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва; ³ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; ⁴ЗАО «Вектор-Бест», 630117, г. Новосибирск

Согласно данным Роспотребнадзора, иммуноферментный анализ (ИФА) выявляет вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах значительно чаще, чем полимеразная цепная реакция (ПЦР). Цель работы – сравнить эффективность обнаружения ВКЭ в иксодовых клещах разных видов с помощью коммерческих наборов на основе ИФА и ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Клещи пяти видов были парентерально заражены ВКЭ европейского или сибирского подтипа. Из зараженных и незараженных особей составляли зашифрованные серии и в слепом эксперименте анализировали их на наличие ВКЭ с использованием наборов реагентов на основе ИФА и ПЦР-РВ.

Результаты. Эффективность детекции ВКЭ обоими методами не зависела от пола, вида клеща и его степени насыщенности кровью. Наборы на основе ИФА оказались менее чувствительными, чем на основе ПЦР-РВ. Отмечена зависимость чувствительности ИФА от подтипа ВКЭ. Наличие ложноположительных реакций и чувствительность ИФА зависели от протокола проведения анализа.

Заключение. Вопрос о причинах расхождения данных по вирусифорности клещей из природы и снятых с людей, полученных разными методами, остается дискуссионным.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; иксодовые клещи; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция в реальном времени; вирусифорность клещей.

Для корреспонденции: Белова Оксана Андреевна, науч. сотр.; e-mail: mikasusha@bk.ru
Correspondence to: Oksana Belova, research associate; e-mail: mikasusha@bk.ru

The Tick-borne encephalitis virus detection efficiency in the Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with elisa and real-time PCR

Belova O. A.^{1,2}, Burenkova L. A.¹, Karan L. S.³, Kolyasnikova N. M.^{1,3}, Topychkanova N. G.⁴, Kuvshinova I. N.⁴, Timofeev D. I.⁴, Rukavishnikov M. Yu.⁴, Grishaev M. P.⁴, Karganova G. G.^{1,2}

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, 142782, Moscow, Russia; ²Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia; ³Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 11123, Moscow, Russia;

⁴Vector-Best JSC, 630117, Novosibirsk, Russia

According to the data of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detects the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks more often than the polymerase chain reaction (PCR). The goal of this work was to compare TBEV detection efficiency in the ixodid ticks of different species with the commercial kits based on ELISA and real-time PCR. Ticks of five species were parenterally infected with 2-6 IgPFU of the European or Siberian TBEV subtypes. We formed randomized and encoded series of infected and intact ticks of different species, and in «blind» experiment analyzed the ticks on the TBEV presence with the kits based on ELISA and real-time PCR. ELISA and real-time PCR effectiveness of the TBEV detection in ticks was not affected by gender, species of ticks or presence of blood meal. The kits based on ELISA were less sensitive than those based on real-time PCR. ELISA effectiveness depended on the TBEV subtype. The presence of the false positive reactions and sensitivity of ELISA were affected by the protocols of reaction. The problem of the different TBEV prevalence in the field-collected ticks obtained with various methods remains to be studied.

Key words: tick-borne encephalitis virus; enzyme-linked immunosorbent assay; real-time polymerase chain reaction; virus prevalence in ticks.

Введение

Показатель зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) имеет огромное значение при составлении эпидемиологической характеристики очага и определении необходимого объема и методов профилактики в эндемичных регионах, а также при определении стратегии индивидуального лечения или профилактики клещевого энцефалита (КЭ) после исследования клещей, снятых с людей. В настоящее время выявление ВКЭ в клещах проводят методами иммуноферментного анализа (ИФА), ОТ-ПЦР и ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ). Показатели зараженности клещей, полученные разными методами, существенно различаются. Согласно данным Роспотребнадзора [1], доля вирусифорных клещей по РФ, собранных в апреле–августе 2011 г., составила 0,17% (136 из 78 995 проанализированных) при анализе клещей методом ПЦР и 5,38% (9308 из 172 919 проанализированных) при анализе клещей методом ИФА.

С помощью ИФА ВКЭ находят в клещах из районов, где никогда не регистрировались и не регистрируются случаи заболевания КЭ. В данной работе мы провели сравнительную оценку чувствительности и специфичности ИФА и ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Клетки. Перевиваемую культуру клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ) поддерживали при температуре 37°C на среде 199 (ПИПВЭ, Москва) с 5% бычьей сыворотки (Фуру, Россия), как описано ранее [2].

Вирусы. В работе использовали ВКЭ – штамм Абсеттаров (GenBank: AF091005.1; [2]) европейского генотипа, выделенный от больного человека в Ленинградской области, где в основном встречается *Ixodes ricinus*, а также штамм ЭК-328 (GenBank: DQ486861.1; [3]) сибирского генотипа, первоначально выделенный из пула клещей *I. persulcatus* в 1972 г. в Эстонии.

Титрование вируса методом бляшек. Титры вируса определяли методом бляшек под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ на пластиковых 6-луночных планшетах согласно описанной методике [2, 4]. Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл вирусосодержащего материала.

Клещи. Всего в экспериментах использовали 405 самок и 350 самцов клещей из лабораторных культур в первом поколении видов *I. ricinus* (Калужская, Смоленская области, Ставропольский край), *I. persulcatus* (республики Карелия и Тыва), *Dermacentor marginatus* (Карачаево-Черкессия), *D. reticulatus* (Калужская и Смоленская области, Ставропольский край), *D. nuttalli* (Республика Тыва). Исходные самки клещей проверили на отсутствие зараженности ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocitophilum* и *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* с помощью набора серии «МультиПрайм»

на четыре инфекции (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора; АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocitophilum*, *E. chaffeensis/E. muris* – FL) на основе ПЦР-РВ.

Заражение клещей. Заражение клещей проводили парентеральным методом, описанным ранее [4, 5]. Клещам вводили под коксу 4-й пары ног культуральную жидкость инфицированных ВКЭ клеток СПЭВ с разной концентрацией вируса. Штаммом Абсеттаров клещей заражали дозами 4 и 6 Ig БОЕ/клещ, а штаммом ЭК-328 – в дозе 2 и 4 Ig БОЕ/клещ. Самкам и самцам рода *Ixodes* вводили по 1 и 0,5 мкл вирусной суспензии соответственно, а клещам рода *Dermacentor* – по 1,5 мкл.

Питание клещей. Для питания клещей рода *Ixodes* использовали белых беспородных мышей (ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, филиал «Андреевка»). На одну мышь сажали не более двух оплодотворенных самок клещей. Методика питания клещей рода *Ixodes* описана ранее [4]. Для питания клещей рода *Dermacentor* использовали кроликов (порода «советская шиншилла», ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, филиал «Электротрогорский»). На одного кролика сажали всех зараженных ВКЭ клещей (32 самки), а на другого – всех незараженных клещей (16 самок). Перед посадкой клещей на спину у кролика в области лопаток выстригали шерсть по периметру квадрата 5×5 см, куда затем приклеивали заранее сшитый колпачок из ткани такого же размера. После того как клей высохал (1–2 ч), в колпачок помещали клещей. Каждый день колпачок развязывали, наблюдали за процессом питания клещей и при необходимости снимали их с кролика.

Получение клещевых суспензий. Приготовление клещевых суспензий для их дальнейшего исследования с помощью наборов на основе ИФА и ПЦР-РВ проводили согласно соответствующим инструкциям. Для проведения вирусологических исследований клещей промывали однократно в 70% этаноле и двукратно в физиологическом растворе с 0,1% ципрофлоксацином (Dr. Reddys'), индивидуально растирали пестиком в отдельной ступке, добавляли 600 мкл среды 199 на растворе Эрла (ФГУП ИПВЭ) с антибиотиками (смесь 100 ед/мл пенициллина и 0,0001 г/мл стрептомицина) и переносили в пробирки типа эппендорф. Таким образом, для голодных половозрелых клещей родов *Ixodes* и *Dermacentor* были получены 0,14 и 0,58% клещевые суспензии из расчета, что средняя масса особи составляет примерно 0,85 и 3,5 мг соответственно. Для полунапитавшихся клещей этих родов были получены суспензии 4,2 и 7,5% при средней массе клещей, питавшихся 3 дня, 25 и 45 мг соответственно.

Анализ клещевых суспензий на наличие антигена ВКЭ методом ИФА. Анализ проводили с помощью набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест») согласно прилагаемой инструкции.

Таблица 1

Средний геометрический титр ВКЭ в клещах разных видов на 5-е и 6-е сутки после парентерального заражения

Вид клеща	Сутки со дня заражения	Средний геометрический титр ВКЭ в клещах, lg БОЕ/клевц	
		штамм ВКЭ	
		ЭК-328	Абсеттаров
<i>I. ricinus</i>	5-е	5,0 ± 0,2	4,6 ± 0,1
	6-е	3,3 ± 0,4	3,6 ± 0,0
<i>I. persulcatus</i>	5-е	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1
	6-е	2,6 ± 0,5	4,3 ± 0,0
<i>D. marginatus</i>	5-е	4,5 ± 0,3	3,6 ± 0,6
	6-е	3,6 ± 0,5	4,0 ± 0,3
<i>D. nuttalli</i>	5-е	4,9 ± 0,0	4,4 ± 0,3
	6-е	3,0 ± 0,3	2,7 ± 0,8
<i>D. reticulatus</i>	5-е	4,9 ± 0,2	3,7 ± 0,5
	6-е	4,3 ± 0,5	4,6 ± 0,1
Всего...	5-е	4,7 ± 0,1	4,1 ± 0,2
	6-е	3,3 ± 0,2	3,6 ± 0,3

Примечание. Статистически достоверные различия получены между: титрами ВКЭ на 5-е и 6-е сутки после заражения (критерий Манна-Уитни; $p < 0,001$); титрами на 5-е сутки (для *I. persulcatus* – на 6-е сутки) после заражения клещей штаммами ЭК-328 и Абсеттаров (критерий Манна-Уитни; $p < 0,008$). Здесь и в табл. 2 титр рассчитан для групп клещей из 2–6 особей.

штамма ЭК-328 на 6-е сутки в клещах *I. persulcatus* по сравнению с таковым в *D. reticulatus* (разница 1,7 lg БОЕ), и была статистически недостоверной (см. табл. 1). Минимальные титры вирусов наблюдали в *D. nuttalli*, однако из-за большого разброса показателей в индивидуальных клещах различия были статистически недостоверны. В самцах и самках титры вируса также статистически не различались (табл. 2).

На 5-е сутки после заражения титры ВКЭ были примерно одинаковыми в клещах, зараженных разными дозами вируса (см. табл. 2). На 6-е сутки наблюдали снижение титров вируса, причем чем ниже была заражающая доза, тем более выраженным было его снижение. Для доз 2 и 4 lg БОЕ штамма ЭК-328 в инокуляте изменения титра вируса в суспензиях клещей, исследованных на 6-е сутки после заражения, были статистически достоверны ($p < 0,02$).

На 5-е сутки значения титров вирусов в клещах были выше, чем на 6-е (см. табл. 1; $p < 0,001$). В целом титры штамма ЭК-328 в клещах на 5-е сутки после заражения были достоверно более высокими, чем титры штамма Аб-

Таблица 2

Средний геометрический титр ВКЭ в самках и самцах клещей на 5-е и 6-е сутки после заражения

Сутки после заражения	Половой состав	Доза ВКЭ в инокуляте			
		штамм ЭК-328		штамм Абсеттаров	
		2 lg БОЕ/клетка	4 lg БОЕ/клетка	4 lg БОЕ/клетка	6 lg БОЕ/клетка
5-е	Самки	4,5 ± 0,2	4,9 ± 0,4	4,0 ± 0,6	3,8 ± 0,3
	Самцы	4,7 ± 0,1	5,0 ± 0,0	4,0 ± 0,8	4,6 ± 0,1
	Всего	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	4,0 ± 0,5	4,2 ± 0,2
6-е	Самки	3,3 ± 0,3	4,3 ± 0,6	2,9 ± 1,3	4,3 ± 0,2
	Самцы	2,4 ± 0,3	4,1 ± 0,6	2,5 ± 1,1	3,8 ± 0,3
	Всего	2,8 ± 0,2	4,2 ± 0,4	2,7 ± 0,8	4,0 ± 0,2

Примечание. Статистически достоверные различия получены между: титрами вируса в клещах обоих полов на 5-е и 6-е сутки после заражения для штамма ЭК-328 в дозе 2 lg БОЕ и для штамма Абсеттаров в дозе 4 lg БОЕ (критерий Манна-Уитни; $p < 0,002$); титрами штамма ЭК-328 на 6-е сутки при заражении клещей разными дозами (критерий Манна-Уитни; $p < 0,02$).

Анализ клещевых суспензий на наличие РНК ВКЭ методом ПЦР-РВ. Перед постановкой ПЦР-РВ проводили выделение РНК из клещевых суспензий с помощью комплектов реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест») согласно инструкциям. Затем на матрице РНК получали кДНК с помощью набора для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Полученную кДНК использовали для детекции ВКЭ методом ПЦР-РВ с применением наборов «АмплиСенс ТВЕ-FL», «АмплиСенс® ТВЕV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* – FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкциям производителя. Также анализ клещей на наличие ВКЭ проводили с помощью набора «РеалБест РНК ВКЭ» (ЗАО «Вектор-Бест») согласно инструкции.

Проведение слепого эксперимента. Партии непитавшихся клещей из 40 самцов и 40 самок пяти видов из двух родов заражали парентерально разными дозами ВКЭ европейского (штамм Абсеттаров) и сибирского (штамм ЭК-328) субтипов и формировали из них и незараженных клещей (16 самок и 16 самцов) рандомизированные зашифрованные серии. На 5-е и 6-е сутки после их заражения зашифрованные серии исследовали на наличие ВКЭ в слепом эксперименте коммерческими наборами на основе ИФА и ПЦР-РВ согласно инструкциям. Одну серию клещей исследовали набором на основе ИФА «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»). Две другие аналогичные серии проанализировали наборами на основе ПЦР-РВ («РеалБест РНК ВКЭ», ЗАО «Вектор-Бест» и «АмплиСенс® ТВЕ-FL», «АмплиСенс® ТВЕV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* – FL», ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Часть зараженных клещей были отобраны на те же сроки, заморожены на -80°C и использованы для определения титров вируса.

Статистическая обработка. В ходе работы использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, а также угловой критерий Фишера и точный метод Фишера для малых выборок данных.

Результаты

Приготовление материала для исследования. Для оценки эффективности выявления ВКЭ наборами на основе ИФА и ПЦР-РВ использовали наиболее распространенные на территории РФ виды клещей, в которых выявляют ВКЭ (табл. 1). Для парентерального заражения клещей использовали ВКЭ европейского (штамм Абсеттаров) подтипа, который чаще всего выявляют в клещах *I. ricinus* в юго-западной части РФ, а также штамм ЭК-328 сибирского подтипа, переносимый клещами *I. persulcatus*. Инфекционная доза штамма Абсеттаров составила 4 и 6 lg БОЕ/клевц, а штамма ЭК-328 – 2 и 4 lg БОЕ/клевц. На 5-е и 6-е сутки после заражения из зараженных и незараженных клещей формировали зашифрованные серии клещей и исследовали на наличие ВКЭ в слепом эксперименте коммерческими тест-системами на основе ИФА и ПЦР-РВ согласно инструкциям. Параллельно для определения титра ВКЭ в клещах на данные сутки после заражения проводили исследование клещевых суспензий из аналогичной серии клещей.

Ранее нами показано, что эффективность парентерального заражения клещей близка к 100% [4, 5]. В данном эксперименте при анализе клещевых суспензий методом бляшек эффективность лабораторного заражения клещей была также высокой и составила 96%. Титры вируса в индивидуально исследованных особях варьировали от 2 до 5,9 lg БОЕ/клевц (в одном клеще титр вируса составил 1,5 lg БОЕ). В целом как на 5-е, так и на 6-е сутки титры ВКЭ в клещах были достаточно высокими. При заражении каждым из штаммов разница между средними геометрическими титрами вируса на один срок в разных видах клещей не превышала 1 lg БОЕ, за исключением титра

Таблица 3

Результаты детекции ВКЭ в клещах методом ИФА по протоколу «Инкубация 3 ч»

Вид клещей	Половой состав	Количество отрицательных результатов в ИФА при данной дозе заражения клещей				Количество ложноположительных результатов
		штамм ЭК-328		штамм Абсеттаров		
		2 lg БОЕ	4 lg БОЕ	4 lg БОЕ	6 lg БОЕ	
<i>I. ricinus</i>	Самки	1/2	0/2	1/2	0/4	0/4
	Самцы	0/2	0/2	0/3	0/4	0/4
<i>I. persulcatus</i>	Самки	2/2	1/2	2/2	0/4	0/4
	Самцы	1/2	0/2	1/2	0/3	0/4
<i>D. marginatus</i>	Самки	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4
	Самцы	1/2	0/2	0/2	0/4	0/4
<i>D. reticulatus</i>	Самки	–	0/1	1/1	1/2	0/1
	Самцы	–	0/1	1/1	0/2	0/2
<i>D. nuttalli</i>	Самки	–	0/2	1/1	0/3	0/3
	Самцы	–	0/1	0/2	0/3	0/2
Итого...	Самки	3/6	1/9	5/8	1/17	0/16
	Самцы	2/6	0/8	2/10	0/16	0/16
Итого для клещей обоих полов...		5/12	1/17	7/18	1/33	0/32

Примечание. Статистически достоверные различия получены между: количеством отрицательных результатов ИФА для клещей, зараженных штаммами ЭК-328 и Абсеттаров в дозе 4 lg БОЕ (точный критерий Фишера; $p < 0,05$); суммарным количеством отрицательных результатов ИФА для инфицированных самок и самцов (точный критерий Фишера; $p < 0,05$).

сеттаров ($p=0,008$), хотя на 6-е сутки различия были уже недостоверными.

Таким образом, в клещевых суспензиях на момент проведения детекции ВКЭ различными методами вирус присутствовал во всех клещах в количестве более 2 lg БОЕ (за исключением 1 клеща *D. nuttalli*).

Результаты ИФА. Для анализа эффективности набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест») использовали клещей, взятых для исследования на 5-е сутки после заражения ВКЭ. Согласно инструкции, к набору возможны два протокола для проведения ИФА – «Инкубация 3 ч» и «Инкубация ночь». По обоим протоколам в слепом эксперименте исследовали 112 клещей: по 30 клещей заразили штаммом ЭК-328, по 50 клещей – штаммом Абсеттаров, 32 особи были интактными. Эффективность (доля правильно определенных результатов во всех пробах) детекции вирусного антигена составила 87,5% при проведении ИФА по протоколу «Инкубация 3 ч» и 88,4% по протоколу «Инкубация ночь». Для ИФА с протоколом «Инкубация 3 ч» ложноположительных реакций выявлено не было. При проведении ИФА по протоколу «Инкубация ночь» на 5% увеличилась чувствительность (доля правильно определенных результатов в группе заведомо положительных проб) детекции ВКЭ в клещах (с 82,5 до 87,5%), но при этом появились ложноположительные результаты (табл. 3–5).

Чувствительность детекции ВКЭ методом ИФА не зависела от вида зараженного клеща (см. табл. 3, 4). Отрицательные результаты, полученные при анализе заведомо зараженных особей, наблюдали при исследовании всех видов клещей.

По результатам обоих способов проведения ИФА чувствительность метода различалась для клещей разного пола (см. табл. 3, 4). Из 14 отрицательных результатов, полученных в ИФА при анализе зараженных клещей с использованием протокола «Инкубация 3 ч», 10 показали самки клещей и лишь 4 – самцы. Однако титры вируса в особях разного пола

были практически одинаковыми на день проведения анализа (5-е сутки) (см. табл. 2). Более того, разница в чувствительности ИФА для самок и самцов клещей оказалась статистически достоверна только при применении углового критерия Фишера ($p < 0,05$). Вероятно, наблюдаемое явление не является закономерностью.

Существенное влияние на результат ИФА оказывал субтип использованного для заражения штамма ВКЭ. Так, при дозе обоих штаммов ВКЭ в инокуляте 4 lg БОЕ/клещ доля отрицательных результатов в ИФА при анализе клещей, зараженных штаммом ЭК-328 (сибирский субтип), составила 5,9% (1/17), а среди клещей, зараженных штаммом Абсеттаров (европейский субтип), – 38,9% (7/18) (см. табл. 3). Разница статистически достоверна (точный метод Фишера; $p \leq 0,05$). Хотя титры штамма Абсеттаров в клещах на момент анализа (5-е сутки после заражения), по нашим данным, были ниже, чем титры ЭК-328 (4 lg БОЕ против 4,8 lg БОЕ), эта разница статистически недостоверна ($p = 0,199$). При заражении клещей штаммом ЭК-328 удавалось выявить вирус в 50% клещей, зараженных минимальной дозой 2 lg БОЕ, где титры были даже ниже 3 lg БОЕ/клещ. При анализе клещей, инфицированных штаммом Абсеттаров, получили отрицательный результат даже при заражающей дозе 6 lg БОЕ. Таким образом, субтип ВКЭ в наших опытах влиял на чувствительность ИФА.

Заметное влияние на результат ИФА оказывала также исходная доза ВКЭ, вводимая в клеща. Несмотря на то что к 5-м суткам титры вируса были примерно одинаковыми в клещах с различными заражающими дозами, наименьшее количество отрицательных результатов наблюдали при анализе особей с высокой исходной дозой заражения (см. табл. 3, 4).

Чувствительность метода ИФА составляла около 50% при титрах ВКЭ в клещах в диапазоне 3–4 lg БОЕ/клещ, т. е. 3,2–4,2 lg БОЕ на 1 мл клещевой суспензии.

Таблица 4

Результаты детекции ВКЭ в клещах методом ИФА по протоколу «Инкубация ночь»

Вид клещей	Половой состав	Количество отрицательных результатов в ИФА при данной дозе заражения клещей				Количество ложноположительных результатов
		штамм ЭК-328		штамм Абсеттаров		
		2 lg БОЕ	4 lg БОЕ	4 lg БОЕ	6 lg БОЕ	
<i>I. ricinus</i>	Самки	0/2	0/2	1/2	0/4	0/4
	Самцы	0/2	0/2	0/3	0/4	0/4
<i>I. persulcatus</i>	Самки	2/2	0/2	1/2	0/4	0/4
	Самцы	1/2	0/2	1/2	0/3	0/4
<i>D. marginatus</i>	Самки	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4
	Самцы	1/2	0/2	0/2	0/4	0/4
<i>D. reticulatus</i>	Самки	–	0/1	1/1	1/2	0/1
	Самцы	–	0/1	1/1	0/2	0/2
<i>D. nuttalli</i>	Самки	–	0/2	0/1	0/3	2/3
	Самцы	–	0/1	0/2	0/3	1/2
Итого...	Самки	2/6	0/9	3/8	1/17	2/16
	Самцы	2/6	0/8	2/10	0/16	1/16
Итого для клещей обоих полов...		4/12	0/17	5/18	1/33	3/32

Примечание. Статистически достоверные различия получены между: количеством отрицательных результатов ИФА для клещей, зараженных штаммами ЭК-328 и Абсеттаров в дозе 4 lg БОЕ (точный критерий Фишера; $p < 0,05$); суммарным количеством отрицательных результатов ИФА для инфицированных самок и самцов (точный критерий Фишера; $p < 0,05$).

Сводные данные по результатам детекции ВКЭ в клещах методом ИФА

Вид клещей	Всего проанализировано клещей	Количество зараженных клещей (исходно)	Количество ложноположительных результатов		Эффективность, %	
			инкубация 3 ч	инкубация 18 ч	инкубация 3 ч	инкубация 18 ч
<i>I. ricinus</i>	29	21	0	0	90,5	95,2
<i>I. persulcatus</i>	27	20	0	0	65,0	75,0
<i>D. marginatus</i>	28	21	0	0	95,2	95,2
<i>D. nuttalli</i>	17	12	0	3	91,7	100,0
<i>D. reticulatus</i>	11	8	0	0	75,0	75,0
Итого...	112	82	0	3	87,5	89,0

Результаты выявления ВКЭ в клещах с помощью ПЦР-РВ. Для проведения анализа с помощью ПЦР-РВ использовали клещей через 6 дней после заражения. На момент проведения ПЦР-РВ титры ВКЭ в клещах были ниже, чем на момент проведения ИФА ($p < 0,001$). Несмотря на этот факт, применение двух коммерческих наборов на основе ПЦР-РВ показало практически 100% эффективность детекции ВКЭ в клещах. При анализе в общей сложности 229 клещей были получены 1 отрицательный (набор «АмплиСенс ТВЕ-FL», «АмплиСенс® ТВЕV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis/E. muris* – FL»; ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и 1 ложноположительный (набор «РеалБест РНК ВКЭ»; ЗАО «Вектор-Бест») результаты (табл. 6). Отрицательную реакцию дал при анализе самец *D. nuttalli*, зараженный 2 lg БОЕ штамма ЭК-328. К моменту проведения анализа он был мертв, поэтому, возможно, вирус в нем успел разрушиться. Ложноположительный результат дала самка *I. persulcatus* из лабораторной культуры.

Минимальный титр ВКЭ, который безошибочно выявлялся методом ПЦР-РВ, составил в среднем 2 lg БОЕ/клещ, т.е. 2,2 lg БОЕ на 1 мл клещевой суспензии.

Таким образом, эффективность и чувствительность детекции ВКЭ в клещах коммерческими наборами на основе ПЦР-РВ выше, чем наборами на основе ИФА.

Результаты детекции ВКЭ в полунапитавшихся клещах. Для проверки влияния степени насыщенности самок кровью на чувствительность и специфичность (доля правильно определенных результатов в группе заведомо отрицательных образцов) детекции ВКЭ самок клещей *I. ricinus* и *D. marginatus*, парентерально зараженных 4 lg БОЕ штаммом ЭК-328, выдерживали в пробирках 4 дня, а затем параллельно с незараженными клещами сажали для питания на мышшей (*I. ricinus*) или кролика (*D. marginatus*). После 3-дневного питания зараженных и незараженных клещей снимали с животных и формировали зашифрованные серии, как в слепом опыте с голодными клещами. Одну серию клещей (16 инфицированных и 7 интактных особей) проанализировали на наличие ВКЭ набором на основе ИФА («ВектоВКЭ-антиген»; ЗАО «Вектор-Бест»), а другую серию – наборами на основе ПЦР-РВ («АмплиСенс ТВЕ-FL», «АмплиСенс® ТВЕV, *B. burgdorferi* sl,

A. phagocytophillum, *E. chaffeensis/E. muris* – FL»; ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Несколько зараженных полунапитавшихся клещей оставили для исследования титра вируса в них на момент проведения детекции ВКЭ.

Титры ВКЭ в *I. ricinus* и *D. marginatus* после 3 дней питания были примерно одинаковыми и составили в среднем $6 \pm 0,2$ lg БОЕ/клещ, что значительно выше, чем в голодных клещах. Наборы на основе как ИФА, так и ПЦР-РВ показали 100% эффективность, ложноположительных реакций выявлено не было.

Обсуждение

По нашим данным, метод ИФА оказался менее чувствительным, чем ПЦР-РВ: доля отрицательных результатов при анализе зараженных ВКЭ клещей составила для ИФА 12,5-17,5% против 0,4% для ПЦР-РВ. Применение протокола «Инкубация ночь» при проведении ИФА привело к незначительному повышению чувствительности метода, а также к снижению специфичности реакций. При проведении нами слепых опытов выявили влияние нескольких факторов на эффективность ИФА: заражающей дозы ВКЭ, субтипа ВКЭ и, по-видимому, протокола проведения реакции. Вид и пол клеща существенного влияния на результат ИФА не оказывали. Эффективность детекции ВКЭ в клещах методом ПЦР-РВ не зависела в наших опытах от вышеперечисленных факторов. Метод ПЦР-РВ показал 100% чувствительность при анализе клещей с титром вируса 2 lg БОЕ/клещ и более, тогда как чувствительность метода ИФА была около 50% при титрах ВКЭ в клещах 3–4 lg БОЕ/клещ.

Как говорилось ранее, по данным Роспотребнадзора [1], вирусофорность клещей, собранных в природе и снятых с людей, установленная методом ИФА, выше, чем при исследовании с помощью ПЦР и ПЦР-РВ. В результате наших исследований мы так и не выяснили причину этого явления. Можно предположить, что возможными причинами могут быть циркуляция в клещах вариантов ВКЭ, не выявляемых коммерческими наборами на основе ПЦР, или близкого к ВКЭ флавивируса, не вызывающего заболевания у людей, но дающего положительную реакцию при проведении ИФА, а также наличие в клеще агента невирусной природы, имеющего серологический перекрест с ВКЭ. В своих опытах мы использовали культуры клещей, прошедших полную генерацию в лабораторных условиях. При переходе на последующую фазу развития клещи частично теряют бактериальные и вирусные агенты, которыми они, возможно, были заражены в природе.

Заключение

В результате проведенного исследования с использованием коммерческих наборов для выявления ВКЭ в клещах на основе ИФА («ВектоВКЭ-антиген»; ЗАО «Вектор-Бест») и на основе ПЦР-РВ («РеалБест РНК ВКЭ»; ЗАО «Вектор-Бест» и «АмплиСенс® ТВЕ-FL»,

Таблица 6

Сводные данные по результатам детекции ВКЭ в клещах коммерческими наборами на основе ПЦР-РВ (тест-системы «АмплиСенс ТВЕ-FL», «АмплиСенс ТВЕV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis/E. muris* – FL»; ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и РеалБест РНК ВКЭ; ЗАО «Вектор-Бест»)

Вид клещей	Всего проанализировано клещей	Количество зараженных клещей	Количество ложноположительных результатов	Эффективность, %
<i>I. ricinus</i>	53	37	0	100
<i>I. persulcatus</i>	56	40	1	100
<i>D. marginatus</i>	56	40	0	100
<i>D. nuttalli</i>	40	28	0	96,4
<i>D. reticulatus</i>	24	16	0	100
Итого...	229	161	1	99,4

«АмплиСенс® ТБЕV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* – FL»); ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) сделали следующие выводы:

- эффективность детекции ВКЭ обоими методами не зависит от пола, вида и степени насыщенности зараженного клеща;

- метод ИФА менее чувствительный, чем ПЦР-РВ;
- отмечена зависимость чувствительности ИФА от субтипа ВКЭ;

- выявлены увеличение чувствительности, но снижение специфичности ИФА при переходе от протокола «Инкубация 3 ч» к режиму «Инкубация ночь».

Исследования, представленные в работе, поддерживаются грантом РФФИ № 14-04-31716-мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Available at: http://rospotrebnadzor.ru/press_center.
2. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivianian T.I. et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2010; 398: 262–72.
3. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivianian T.I., Bakhtmutov D.V., Lukashov A.N., Gmyl L.V. et al. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362: 75–84.
4. Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially en-

gorged ixodid ticks – Evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012; 3(4): 240–6.

5. Белова О.А., Козловская Л.И., Романова Л.Ю., Шевцова А.С., Буренкова Л.А. Сравнительный анализ эффективности различных методов заражения иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита. В кн.: *Медицинская вирусология. Труды ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН*. М., 2008; т. 25: 47–52.

Поступила 22.10.13

REFERENCES

1. Available at: http://rospotrebnadzor.ru/press_center.
2. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivianian T.I. et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2010; 398: 262–72.
3. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivianian T.I., Bakhtmutov D.V., Lukashov A.N., Gmyl L.V. et al. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362: 75–84.
4. Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks – Evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012; 3: 240–6.
5. Belova O.A., Kozlovskaya L.I., Romanova L.Yu., Shevtsova A.S., Burenkova L.A. Comparative analysis of the effectiveness of different ixodid ticks' infection methods with TBEV. In: *Meditsinskaya virusologiya: Trudy IPVE imeni M.P. Chumakova*. Moscow, 2008; vol. 25: 47–52. (in Russian)

Received 22.10.13

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.98:578.826.11-078.33-073.537

Амосова И.В., Соминина А.А., Смирнова Т.Д., Суховецкая В.Ф., Бузицкая Ж.В., Войцеховская Е.М., Сироткин А.К.

Новые моноклональные тест-системы для диагностики аденовирусной инфекции

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Изучены диагностические свойства новых моноклональных антител (МКА) к гексонному антигену аденовируса и моноклональной иммуноферментной тест-системы (ИФТС) «Аденовир», предназначенной для ранней диагностики аденовирусной инфекции. Полученные ИФТС и коньюгаты новых моноклональных антител для иммунофлюоресцентной диагностики использованы для детекции различных типов аденовирусов в клинических материалах. Обоснована перспективность использования новых тест-систем в клинико-эпидемиологической практике.

Ключевые слова: аденовирус; моноклональные антитела; диагностические тест-системы.

New monoclonal kits for the diagnosis of the adenoviral infection

Amosova I. V., Sominina A. A., Smirnova T. D., Sukhovetskaya V. F., Buzitskaya Zh. V., Voitsehovskaya E. M., Sirotkin A. K.

Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia

Diagnostic properties of new monoclonal antibodies (MAbs) to hexon adenovirus antigen (AB) monoclonal ELISA kit for early diagnosis of adenoviral infection were tested. Developed ELISA kit and FITC-conjugate of new monoclonal antibodies for immunofluorescent analysis were used for detection of different types of adenoviruses in clinical materials. The availability of their use in clinical and epidemiological practice was validated.

Key words: adenovirus; monoclonal antibodies; diagnostic kits.

Для корреспонденции: Амосова Ирина Викторовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: amosova.23@mail.ru
Correspondence to: Irina Amosova, PhD in Biology; e-mail: amosova.23@mail.ru