

Пирожков А.П.¹, Тимофеев М.А.¹, Борисевич И.В.², Сыромятникова С.И.¹, Шатохина И.В.¹, Пантюхов В.Б.¹, Ковальчук А.В.¹, Борисевич С.В.¹

Чувствительность и специфичность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад-6; ²ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Москва

В статье обсуждаются методические подходы, использованные для определения чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа (ИФА). Сравнение ИФА и реакции нейтрализации (РН) показало наличие прямой зависимости между уровнем титров антител в сыворотках крови иммунизированных животных, определяемых обоими методами. Полученные результаты позволили сформировать панели положительных и отрицательных сывороток крови для определения чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов. Чувствительность набора реагентов при изучении проб сывороток крови иммунизированных морских свинок и кроликов (определяемых в РН как положительные) составила не менее 98%. При изучении проб, которые определяются в РН как сомнительные, чувствительность набора реагентов составила не менее 68% при специфичности 98%.

Ключевые слова: набор реагентов; иммуноферментный анализ; выявление антител; чувствительность; специфичность; аргентинская геморрагическая лихорадка, вирус Хунин.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 46–49.*

Pirozhkov A.P.¹, Timofeev M.A.¹, Borisevich I.V.², Syromiatnikova S.I.¹, Shatokhina I.V.¹, Pantyukhov V. B.¹, Kovalchuk A.V.¹, Borisevich S.V.¹

Sensitivity and specificity of the elisa kit for the detection of antibodies to Junin virus

¹ Central Scientific Research Institute N. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad, Russia; ² Scientific Center for Expertise of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

The goal of this work was to describe methodological approaches to determination of sensitivity and specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA Kit) for detection of the specific anti-Junin virus (JV) antibody. Comparison of ELISA to plaque reduction neutralization test (PRNT) showed direct relationship between antibody titers in the samples of serum of immunized animals, determined by either PRNT or ELISA methods. The obtained results provided an opportunity to form the panels of positive and negative serum samples to determine the sensitivity and specificity of the ELISA Kit. Sensitivity of the ELISA Kit was at least 98% when studying the samples of serum of immunized guinea pigs and rabbits (determined as positive in PRNT). The sensitivity of the ELISA Kit was at least 68% when studying the samples determined by PRNT as uncertain positive. The specificity was 98%. The specificity of the ELISA Kit was 98%.

Key words: reagent kit; enzyme linked immunosorbent assay; antibody detection; sensitivity; specificity; Argentine hemorrhagic fever; Junin virus.

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 46–49. (In Russ.)*

Аргентинская геморрагическая лихорадка (АГЛ) – особо опасная природно-очаговая инфекция, возбудителем которой является вирус Хунин (род *Arenavirus*, семейство *Arenaviridae*). Заболевание характеризуется тяжелым течением с выраженным геморрагическим синдромом, поражением различных органов и высокой летальностью. В среднем летальность при АГЛ составляет от 10 до 20%, количество тяжелых форм заболевания достигает 40% [1–3]. При своевременном введении иммунной плазмы реконвалесцентов в первые 8 сут летальность снижается до 1% [4, 5].

Ареал инфекции находится в Аргентине в местах обитания природных хозяев возбудителя *Calomys musculinus* и *S. lausha*, у которых инфекция протекает в латентной форме. Инфицирование людей обычно происходит при контакте с зараженными грызунами или аэрогенно при вдыхании инфекционных продуктов выделений

грызунов. Источником инфекции также может быть и больной человек, но вероятность передачи заболевания от больных людей (контагиозность) низкая [6–8]. Заболеваемость АГЛ составляет от 100 до 4000 человек ежегодно. При серологическом обследовании населения в эпидемических очагах количество серопозитивных составляло до 12% [1–3].

Специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России разработан набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови человека, предназначенный для применения в практике мобильных диагностических групп Центра специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний [9]. Одним из этапов разработки диагностических наборов реагентов является лабораторно-экспериментальное изучение, в ходе которого оценива-

ют чувствительность и специфичность экспериментальных серий препарата.

В связи с этим целью данной работы было лабораторно-экспериментальное изучение чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА.

Согласно требованиям Санитарных правил 3.3.2.561–96 и ГОСТ Р ЕН 13612–2010, при клинических испытаниях диагностических препаратов чувствительность разработанных наборов реагентов необходимо оценивать на материале, полученном от лиц (пробандов) опытной группы, а специфичность определять на материале, полученном от лиц контрольных групп. При этом основную группу следует формировать из больных и носителей возбудителя того инфекционного заболевания, для диагностики которого предназначен препарат. Диагноз должен быть подтвержден другими надежными методами исследования. В контрольные группы необходимо включать здоровых людей и лиц с заболеваниями, сходными по клинической картине с заболеванием лиц основной группы. Отсутствие на территории РФ заболеваемости особо опасными аренавирусными инфекциями исключало возможность использования для оценки чувствительности и специфичности набора реагентов материалов от больных АГЛ и схожими заболеваниями. Кроме того, в РФ в настоящее время также отсутствуют зарегистрированные препараты для диагностики АГЛ, что исключало проведение сравнительной оценки чувствительности. Таким образом, для решения поставленной цели необходимо было обосновать методику проведения оценки чувствительности и специфичности и провести лабораторно-экспериментальное изучение серий препарата.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штамм ХJ вируса Хунин, депонированный в Национальной коллекции штаммов вирусов геморрагических лихорадок I группы патогенности в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исходная культура поступила в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР. Эталонная (музейная) культура штамма была приготовлена путем проведения двух пассажей через головной мозг белых мышей-сосунков.

Рабочую культуру вируса Хунин получали путем культивирования в постоянной линии клеток Vero (V) в ферментерах на микроносителе Cytodex-3 по определенной методике [10].

Инактивацию вируса проводили с помощью формалина в конечной концентрации формальдегида 0,0165% по объему. Для получения концентрированного очищенного препарата вируса Хунин использовали метод осаждения с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) мол. массой 6000 D и метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. К осветленной вирусосодержащей жидкости добавляли 5 N раствор натрия хлорида до конечной концентрации 0,3 N и 50% раствор ПЭГ-6000 до конечной концентрации 7%. Суспензию тщательно перемешивали и оставляли на 18–20 ч при температуре от 2 до 6°C. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 40 000 g в течение 1 ч при температуре от 2 до 6°C. После центрифугирования осадок растирали и добавляли трис-HCl-буфер (рН 7,3). Полученную суспензию осветляли центрифугированием в течение 15 мин при 20 000 g. Надосадочную жидкость наслаивали на линейный градиент 25 – 50% сахарозы и центрифугировали в течение 150 мин при 80 000 g при температуре от 2 до 6°C. Фракцию сахарозы, содержащую антиген вируса Хунин, диализировали против трис-HCl-буфера (рН 7,3) при температуре от 2 до 6°C в течение 24 ч с двукратной сменой раствора.

Для оценки специфичности набора реагентов использовали сыворотки крови морских свинок и кроликов, иммунизированных культурой вируса Ласса, штамм Сьерра-Леоне, который депонирован в Национальной коллекции штаммов вирусов геморрагических лихорадок I группы патогенности в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исходная культура была получена из музея Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Животные. Использовали аутобредных морских свинок (масса от 0,2 до 0,3 кг) и кроликов породы шиншилла массой от 2 до 2,5 кг. Животных получали из вивария ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Для получения иммунной сыворотки морским свинкам вводили внутрибрюшинно вирусосодержащую культуральную жидкость в дозе 1000 БОЕ. Кроликов иммунизировали троекратно с интервалом 14 сут согласно схеме, представленной ранее [11]. Отбор крови производили на 30-е сутки после инфицирования у выживших животных.

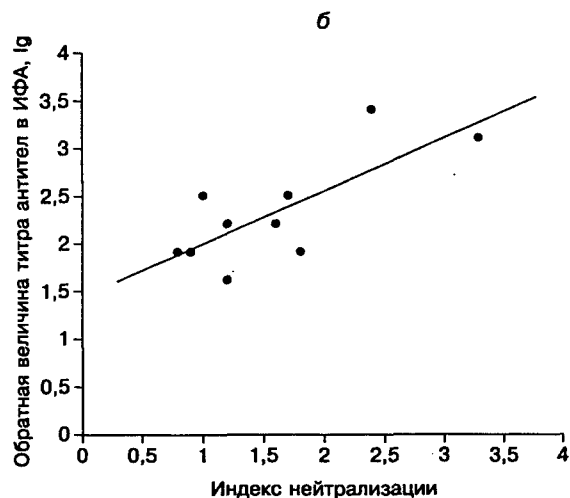
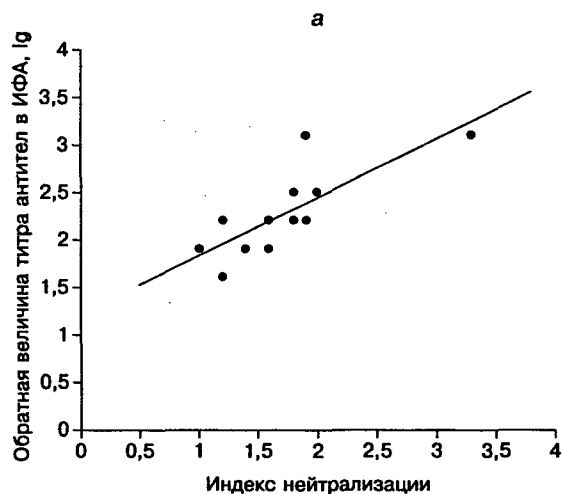
ИФА. Выявление антител проводили с помощью набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом иммуноферментного анализа «ИФА-АТ-Хунин» (экспериментальные серии № 01/09, 02/09, 03/09), изготовленного в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, согласно инструкции по применению. В качестве конъюгата для выявления специфических антител использовали белок А, конъюгированный с биотином («Sigma», кат. № Р 2165), и стрептавидин с пероксидазой хрена («Sigma», кат. № S 5512) в стабилизирующем буферном растворе [12]. Учет результатов анализа проводили на фотометре Multiskan EX фирмы «Labsystems» при длине волны 450 нм. Результаты анализа считали положительными, если среднее значение оптической плотности в лунках с исследуемым образцом превышало значение оптической плотности в лунках с отрицательным контролем на 0,2 [13].

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили с использованием постоянной культуры клеток GMK-AN-1(D) методом подавления бляшкообразования под агаром [14]. Расчет биологической активности вируса Хунин при титровании на культуре клеток проводили по методике Кербера в модификации И.П. Ашмарина [15]. Нейтрализующую способность сыворотки выражали в виде индекса нейтрализации (в случае использования разных разведений вируса и одного разведения сыворотки) и в виде титра вируснейтрализующих антител (при использовании разных разведений сыворотки и одного разведения вируса). Индекс нейтрализации (максимальное количество вируса, которое может быть нейтрализовано сывороткой) от 0 до 1,0 расценивался как отрицательный, от 1,0 до 1,7 – как сомнительный и выше 1,7 – как положительный [16].

Результаты и обсуждение

В ходе исследований проведена оценка возможности сравнения чувствительности разработанного набора реагентов и реакции нейтрализации. На первом этапе исследований необходимо было подтвердить наличие прямой зависимости между уровнем титра антител в ИФА и нейтрализующей способностью сывороток крови иммунизированных животных. Были изучены сыворотки крови кроликов и морских свинок, результаты исследования представлены на рисунке. Установлено, что между уровнем титров антител в ИФА и индексом нейтрализации в реакции нейтрализации существует прямая зависимость. Коэффициент корреляции при изучении сывороток крови иммунизированных кроликов и морских свинок составил 0,78 и 0,75 соответственно.

Полученные результаты позволили провести сравнительную оценку чувствительности реакции нейтрализа-



Зависимость между титром антител в ИФА и индексом нейтрализации сывороток крови иммунизированных вирусом Хунин кроликов (а) и морских свинок (б).

ции и разработанного набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА при качественном анализе сывороток крови лабораторных животных на наличие вирусспецифических антител (табл. 1).

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что разработанный набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА обладает более высокой чувствительностью по сравнению с реакцией нейтрализации.

Следовательно, в результате проведенных исследований установлено, что для оценки чувствительности разработанного набора реагентов можно использовать пробы сыворотки крови, содержание специфических антител в которых подтверждено реакцией нейтрализации. Поэтому на следующем этапе работы были отобраны пробы сыворотки крови у лабораторных животных, в которых были выявлены вируснейтрализующие антитела. При создании панели сывороток был использован подход, описанный ранее [17], в основе которого лежит принцип использования двух групп сывороток с низким и высоким уровнем специфических антител. Для каждого вида животных были сформированы по две опытные группы сывороток крови, одна с индексом нейтрализации более 1,7, а другая – от 1,0 до 1,7. Общее количество проб каждой группы доводили до 50 путем смешивания сывороток. При выявлении антител в сыворотке крови инфицированных животных также были исследованы другие показатели диагностической эффективности набора реагентов, одним из которых являлась специ-

фичность. Для изучения данного показателя, помимо опытной группы проб (состоящих из заведомо положительных сывороток), была сформирована контрольная группа проб, состоящая из сывороток крови животных, инфицированных возбудителем того же семейства, – аренавирусом Ласса. Индекс нейтрализации сывороток контрольной группы составлял от 1,7 до 2,0. Результаты изучения диагностической эффективности набора реагентов, представленные в табл. 2, позволяют сделать вывод о том, что при изучении заведомо положительных проб с высоким уровнем специфических антител (индекс нейтрализации более 1,7) набор реагентов обладает чувствительностью (отношение количества положительных результатов в опытной группе к общему количеству проб в этой группе) не менее 98%. При изучении положительных проб с низким уровнем специфических антител (индекс нейтрализации от 1,0 до 1,7) чувствительность составила не менее 68%. Специфичность набора реагентов, которая представляла собой отношение количества отрицательных результатов в контрольной группе к общему количеству проб в этой группе, составила не менее 98%. Ожидаемая ценность положительного результата (отношение количества положительных результатов в обеих опытных группах к общему количеству положительных результатов) составила

Таблица 1
Сравнительная оценка чувствительности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин в ИФА и реакции нейтрализации

Лабораторное животное	Число проб сыворотки крови	Доля положительных результатов (в %) при использовании			
		набора реагентов серии №			реакции нейтрализации
		1	2	3	
Морская свинка	10	90,0	80,0	80,0	40
Кролик	12	91,6	83,3	91,6	50

Примечание. Все пробы, положительные в реакции нейтрализации, давали также положительную реакцию в ИФА.

Таблица 2
Диагностическая эффективность набора реагентов при исследовании проб сыворотки крови инфицированных морских свинок и кроликов

Лабораторное животное	Исследуемые пробы	Индекс нейтрализации проб	Результат ИФА	
			положительный	отрицательный
Морская свинка	Опытные	1,7–2,0	49	1
		1,0–1,7	38	12
	Контрольные	1,7–2,0	0	50
Кролик	Опытные	1,7–3,0	50	0
		1,0–1,7	34	16
		1,7–2,0	1	49

Примечание. Индекс нейтрализации для основной группы установлен в реакции нейтрализации с культурой штамма ХJ вируса Хунин, для контрольной группы проб – с культурой штамма Сьерра-Леоне вируса Ласса.

не менее 99%, отрицательного (отношение количества отрицательных результатов в контрольной группе к общему количеству отрицательных результатов) не менее 75%.

Заключение

Проведено лабораторно-экспериментальное изучение чувствительности и специфичности набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА.

Разработаны методические подходы к способу определения чувствительности набора реагентов для выявления антител к аренавирусу I группы патогенности Хунин. Установлено, что титры антител в ИФА, которые выявляются в сыворотках иммунизированных лабораторных животных с помощью разработанного набора реагентов, находятся в прямой корреляции с индексом нейтрализации. При этом набор реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА обладает более высокой чувствительностью по сравнению с реакцией нейтрализации.

Чувствительность набора реагентов для выявления антител к вирусу Хунин методом ИФА при изучении проб сывороток крови иммунизированных морских свинок и кроликов, определяемых в реакции нейтрализации как положительные, составила не менее 98%. При изучении проб, которые определяются в реакции нейтрализации как сомнительные, чувствительность набора реагентов составила не менее 68%. Специфичность набора реагентов при изучении проб сывороток крови морских свинок и кроликов, иммунизированных вирусом Ласса, составила не менее 98%.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Bracco M.E., Rimoldi M.T. Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Medicine*. 1970; 299 (5): 216–21.
2. Maiztegui J.I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bulletin of The World Health Organization*. 1975; 52 (4–6): 567–75.
3. Peters C.J. Arenaviruses. In: Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G., eds. *Clinical Virology*, 2nd ed. Washington: ASM Press; 2002: 949–69.
4. Enria D.A., Briggiler A.M., Fernandez N.J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet*. 1984; 8397: 255–6.
5. Maiztegui J.I., Fernandez N.J., de Damilano A.J. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. 1979; 324 (8154): 1216–7.
6. Strickland T.G., Mills J.N., McKee Jr K.T. South American Hemorrhagic Fevers. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2000; 31 (3): 279–81.
7. Childs J.E., Peters C.J. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In: Saivato M.S., eds. *The Arenaviridae*. Plenum. New York; 1993: 331–73.
8. Bowen M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: Patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997; 8: 301–16.
9. Онщенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Борисевич И.В., Марков В.И. Центр специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний в системе противоэпидемической защиты территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2001; 6: 114–5.
10. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Потрываева Н.В., Малинкин Ю.Н., Кириллов А.П., Краснянский В.П. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения антигена вируса Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1996; 41 (5): 232–4.
11. Орлова С.В., Годнева А.Т., Игнат'ев Г.М. Иммунизация кроликов вирусом Ласса. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35 (1): 59–61.
12. Пирожков А.П., Борисевич И.В., Снеткова О.Ю., Андрюшук И.А., Сыромятникова С.И., Хмелев А.Л. и др. Стабилизация пероксидазных конъюгатов иммуноферментных наборов реагентов для выявления антигенов вирусов Эбола и Марбург. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (1): 45–8.
13. Пирожков А.П., Борисевич И.В., Хмелев А.Л., Снеткова О.Ю.,

- Марков В.И., Максимов В.А. и др. Разработка иммуноферментных тест-систем для диагностики особо опасных геморрагических лихорадок. *Биотехнология*. 2009; 4: 91–5.
14. Хмелев А.Л., Борисевич И.В., Пантюхов В.Б., Пирожков А.П., Сыромятникова С.И., Шагокина И.В. и др. Использование морских свинок для оценки эффективности гетерологичного иммуноглобулина против Боливийской геморрагической лихорадки. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54 (4): 42–4.
 15. Ашмарин И.П., Вороб'ев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Гос. изд. мед. лит.; 1962.
 16. Здродовский П.Ф., Соколов М.И., ред. *Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней*. М.; 1965.
 17. Канаев А.Н., Воробьева М.С., Шалунова И.В., Перебоева Л.А., Максютов А.З., Киселев Н.Н. и др. Конструирование стандартных панелей сывороток с нормированным уровнем IgG-антител. *Вопросы вирусологии*. 1996; 4: 161–6.

REFERENCES

1. De Bracco M.E., Rimoldi M.T. Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Medicine*. 1970; 299 (5): 216–21.
2. Maiztegui J.I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bulletin of The World Health Organization*. 1975; 52 (4–6): 567–75.
3. Peters C.J. Arenaviruses. In: Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G., eds. *Clinical Virology*, 2nd ed. Washington: ASM Press; 2002: 949–69.
4. Enria D.A., Briggiler A.M., Fernandez N.J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet*. 1984; 8397: 255–6.
5. Maiztegui J.I., Fernandez N.J., de Damilano A.J. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. 1979; 324 (8154): 1216–7.
6. Strickland T.G., Mills J.N., McKee Jr K.T. South American Hemorrhagic Fevers. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2000; 31 (3): 279–81.
7. Childs J.E., Peters C.J. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In: Saivato M.S., eds. *The Arenaviridae*. Plenum. New York; 1993: 331–73.
8. Bowen M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: Patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997; 8: 301–16.
9. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Borisевич I.V., Markov V.I. Center for Special laboratory diagnosis, and treatment of high-risk and exotic infectious diseases in the system of protection of anti-epidemic in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2001; 6: 114–5. (in Russian)
10. Borisевич I.V., Mikhaylov V.V., Potryvaeva N.V., Malinkin Yu.N., Kirillov A.P., Krasnianskii V.P. et al. Development of an enzyme immunoassay test system for the determination of the Ebola virus antigen. *Voprosy virusologii*. 1996; 41 (5): 232–4. (in Russian)
11. Orlova S.V., Godneva A.T., Ignat'ev G.M. Immunization of rabbits with Lassa virus. *Voprosy virusologii*. 1990; 35 (1): 59–61. (in Russian)
12. Pirozhkov A.P., Borisевич I.V., Snetkova O.Yu., Androshchuk I.A., Syromiatnikova S.I., Khmelev A.L. et al. Stabilization of peroxidase conjugate immunoassay reagent kits for the detection of antigens of viruses Ebola and Marburg. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (1): 45–8. (in Russian)
13. Pirozhkov A.P., Borisевич I.V., Khmelev A.L., Snetkova O.Yu., Markov V.I., Maksimov V.A. et al. Development of ELISA test systems for the diagnosis of high-risk of hemorrhagic fever. *Biotechnologiya*. 2009; 4: 91–5. (in Russian)
14. Khmelev A.L., Borisевич I.V., Pantyukhov V.B., Pirozhkov A.P., Syromiatnikova S.I., Shatokhina I.V. et al. The use of guinea pigs to evaluate the effectiveness of heterologous immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever. *Voprosy virusologii*. 2009; 54 (4): 42–4. (in Russian)
15. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical methods in microbiological studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: St. pub. med. lit.; 1962. (in Russian)
16. Zdrodovskiy P.F., Sokolov M.I., eds. *Manual for the laboratory diagnosis of viral and rickettsial diseases [Rukovodstvo po laboratornoy diagnostike virusnykh i rikketsioznykh bolezney]*. M.; 1965. (in Russian)
17. Kanaev A.N., Vorobyeva M.S., Shalunova I.V., Pereboeva L.A., Maksyutov A.Z., Kiselev N.N. et al. Construction of standard panels of sera with a normalized level of IgG-antibody. *Voprosy virusologii*. 1996; 4: 161–6. (in Russian)