

Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 14.518.11.7035.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 6, 11, 12 см.
REFERENCES)

3. Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С. и др. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 1 (111): 88–92.
4. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Скарнович М.О., Сергеев Ар.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах in vivo. *Вопросы вирусологии*. 2013; 4: 39–43.
5. Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С. и др. Использование мышей в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2: 60–5.
7. *Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных*: Пер. с англ. Вашингтон: National Academy Press; 1996.
8. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Статистика; 1976.
9. Струков А.И. Инфекционные болезни. Available at: http://vmede.org/sait/?page=28&id=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010&menu=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010. (Дата обращения 16.12.2013).
10. Бороноев С.А. *Клиническая оториноларингология. Учебно-методическое пособие*. Улан-Удэ: Издательство Бурятского государственного университета; 2008.

REFERENCES

1. Hutson C.L., Carroll D.S., Self J., Weiss S., Hughes C.M., Braden Z. et al. Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease. *Virology*. 2010; 402 (1): 72–82.
2. Zaucha G., Jahrling P., Geisbert T., Swearingen J., Hensley L. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in

- cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Lab. Invest.* 2001; 81: 1581–600.
3. Sergeev Al.A., Bulychev L.E., Piankov O.V., Sergeev Ar.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S. et al. Sensitivity of different animal types to monkeypox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; 1 (111): 88–92. (in Russian)
4. Kabanov A.S., Sergeev Al.A., Shishkina L.N., Bulychev L.E., Skarnovich M.O., Sergeev Ar.A. et al. Comparative studying antiviral activity of chemical compounds concerning of orthopoxviruses in vivo experiments. *Voprosy virusologii*. 2013; 4: 39–43. (in Russian).
5. Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Piankov O.V., Sergeev Ar.A., Taranov O.S. et al. Exploitation of mouse model for assessment of therapeutic and prophylactic efficacy of drugs against monkeypox. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 2: 60–5. (in Russian)
6. Lepar-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.H., Fuchs F., Crance J.M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 47–52.
7. *The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]: Transl. from Engl. Washington: National Academy Press; 1996. (in Russian)
8. Zaks L. *Statistical Estimation* [Statisticheskoe otsenivanie]. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
9. Strukov A.I. Infectious diseases. Available at: http://vmede.org/sait/?page=28&id=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010&menu=Anatomija_patologicheskaja_strukov_2010. (Access 16 December 2013) (in Russian)
10. Boronoev S.A. *Clinical Otolaryngology. Teaching Aid*. [Klinicheskaya otorinolaringologiya. Uchebno-metodicheskoe posobie]. Ulan-Ude: Izdatel'stvo Buryatskogo gosuniversiteta; 2008. (in Russian)
11. Americo J.L., Moss B., Earl P.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *J. Virol.* 2010; 84 (16): 8172–80.
12. Hutson C.L., Olson V.A., Carroll D.S., Abel J.A., Hughes C.M., Braden Z.H. et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (Pt. 2): 323–33.

Поступила 27.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 578.831.1/578.832.083.3

Виткова О.Н.¹, Капустина О.В.², Лобова Т.П.¹, Михайлова В.В.¹, Сафонов Г.А.⁵, Власова Н.Н.³, Белоусова Р.В.⁴

Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминесцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла

¹ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» Россельхознадзора, 111622, г. Москва; ²ГНУ «Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук, 601120, г. Покров; ³ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») Россельхознадзора, 600901, г. Владимир; ⁴ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва; ⁵Российская академия наук, 117334, г. Москва

В статье представлены результаты исследований по разработке твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) с иммунохемилюминесцентной (ИХА) и колориметрической детекцией для выявления специфических вирусных антигенов и антител при диагностике гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Показана высокая специфичность и чувствительность ИХА, которая в 10–50 раз превышает таковую ИФА с колориметрическим методом детекции. Высокая результативность наряду с автоматизацией процесса лабораторного исследования (использование планшетного люминометра) позволяют рекомендовать ИХА для включения в число методов для первичного скрининга указанных инфекций.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; хемилюминесцентная детекция; иммунохемилюминесцентный анализ; твердофазный иммуноферментный анализ; грипп птиц; болезнь Ньюкасла; пероксидаза хрена; люминометрический метод; люминол.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (6): 41–45.

Для корреспонденции: Виткова Ольга Николаевна, канд. вет. наук, зам. директора по диагностической работе; e-mail: olgavitkova@mail.ru

Comparative research into sensitivity and specificity of immune-enzyme analysis with chemiluminescence and colorimetric detection for detecting antigens and antibodies to avian influenza viruses and newcastle disease

¹Central Scientific-Methodological Veterinary Laboratory, Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, 111662, Moscow, Russia; ²All-Russia Scientific-Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 601120, Pokrov, Russia; ³Federal Center for Animal Health Protection, Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, 600901, Vladimir, Russia; ⁴Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 109472, Moscow, Russia; ⁵Russian Academy of Sciences, 117334, Moscow, Russia

The goal of this work was to demonstrate the results of the development of the enzyme-linked immunosorbent tests with chemiluminescence detection and colorimetric detection of specific viral antigens and antibodies for identifying the avian influenza and the Newcastle disease viruses: high sensitivity and specificity of the immuno-chemiluminescence assay, which are 10-50 times higher than those of the ELISA colorimetric method. The high effectiveness of the results and the automation of the process of laboratory testing (using a luminometer) allow these methods to be recommended for including in primary screening tests for these infectious diseases.

Key words: enzyme immunoassay; chemiluminescence detection; immuno-chemiluminescence analysis; enzyme-linked immunosorbent assay; avian influenza; Newcastle disease; horseradish peroxidase; luminometric method; luminol.

Received 24.03.14

For correspondence: Olga Vitkova, Candidate of veterinary Sciences; e-mail:olgavitkova@mail.ru

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(6): 41–45. (In Russ.)

Введение

Грипп птиц (ГП) и болезнь Ньюкасла (БН) являются значимыми высококонтагиозными инфекционными болезнями птиц, которые остаются актуальной проблемой птицеводства [1–4]. В последние годы ГП типа А регистрировали в различных странах мира. В 2013 г., по данным МЭБ, вспышки ГП отмечались в 13 странах – наибольшее количество в Китае, Камбодже, Австралии, Мексике, Непале, Италии, в 2014 г. в 11 странах – наибольшее в Китае, Вьетнаме, Корее. В 2013–2014 гг. часто выявляли подтипы вируса, имеющие антигенные формулы H5N1, H5N2, H5N6, H5N8, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9 [5–7].

Эпизоотологический и серологический мониторинг – важное звено в контроле распространения инфекционных болезней [8, 9]. В лаборатории Российской Федерации для диагностики ГП и БН поступают тысячи проб патологического материала и сывороток крови от птиц различных видов. Так, в 2013 г. в целях выявления вируса БН и специфических антител к нему исследовано 3635 проб патматериала и более 52 тыс. проб сыворотки крови. Для диагностики ГП исследовано 107 457 проб патологических и биологических материалов и более 570 тыс. проб сыворотки. В ветеринарных лабораториях России для диагностики данных инфекций используют классические методы – вирусологический и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), а также современные методы иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразную цепную реакцию.

Современные тенденции разработки новых и совершенствования существующих методов и диагностических тест-систем направлены на повышение чувствительности и специфичности при выявлении вирусных антигенов и соответствующих специфических антител. Перспективными представляются исследования по повышению чувствительности ИФА при использовании флюоресцентных и хемилуминесцентных субстратов. Одним из современных методов лабораторной диагностики иммунологического профиля является иммунохемилуминесцентный анализ (ИХА) [9, 10].

Принцип метода заключается во взаимодействии люминола и перекиси водорода в присутствии пероксидазы хрена, конъюгированной с вторичными антителами, что приводит к образованию окисленного люминола, который обладает люминесцентным свечением. Интенсивность хемилуминесценции пропорциональна количеству исследуемого белка (антигена, антител) в пробе. Использо-

вание люминометрического метода исследований в ветеринарии находится только на начальном этапе.

В задачи исследований входили разработка ИФА с хемилуминесцентной детекцией; сравнительное изучение чувствительности и специфичности ИХА и ИФА с колориметрической детекцией при выявлении специфических антигенов и антител для диагностики ГП и БН.

Материалы и методы

Для исследования использовали компоненты, входящие в набор препаратов на основе моноклональных антител (МКА) для дифференциальной диагностики ГП и БН твердофазным иммуноферментным методом серии № 2 от 2012 г. производства ГНУ ВНИИВиМ; компоненты, входящие в набор для выявления антител к вирусу ГП с помощью ТФ ИФА серии № 3 от 2013 г. производства НПП «Авивак»; антигены вирусов ГП и БН; пероксидазные конъюгаты соответствующих МКА; нативные антигены в виде инактивированной 0,1% теотропином экстраэмбриональной жидкости эмбрионов кур (ЭЭЖ ЭК), инфицированных вирусами ГП (антиген 1) штамм A/tern/South Africa/61/ H5N3; ГП штамм А/цыпленок/Росток/34/H7N1 (антиген 2); вирусом БН штамм велогенный Томилинский-53 (антиген 3); лентогенный штамм Ла-Сота (антиген 4); 20% суспензию внутренних органов птиц, экспериментально зараженных вирусом БН штамм Томилинский-53, осветленную низкоскоростным центрифугированием (антиген 5); смесь антигенов ГП и БН (антиген 6); рекомбинантный нуклеопротеин (Rek NP) вируса гриппа типа А, полученный в прокариотической системе экспрессии, и концентрированный культуральный антиген вируса инфекционной бурсальной болезни (ИББ) штамм Winterfield 2512. Используемые специфические антигены имели активность в твердофазном ИФА (ТФ ИФА) не ниже 1:1024.

Для отработки оптимальных параметров анализа в качестве модельной тест-системы выбран двойной антителный сэндвич-вариант ТФ ИФА (ДАС ТФ ИФА) на основе неконкурирующих между собой МКА к нуклеопротеинам вирусов ГП и БН, иммобилизованных на поверхности полистиролового планшета, и антитела, меченные ферментом, – пероксидазой хрена. Эта система является одной из наиболее распространенных для анализа поливалентных антигенов.

В качестве окислителя использовали перекись водорода, а активность пероксидазы оценивали по интенсивности

Выявление специфических антигенов вирусов ГП и БН в ДАС ТИФА с хемилюминесцентной детекцией

Исследуемая проба	Рабочая доза конъюгата МКА*			
	RLU-1000		в разведении 1:10 RLU-1000	
	ГП	БН	ГП	БН
Антиген БН лиофилизированный**	551±0,10	70484±0,15	86±0,09	6982±0,20
Антиген ГП лиофилизированный**	1187±0,12	5883±0,10	66078±0,10	761±0,17
Антиген 1 ГП Н5Н3 ЭЭЖ ЭК (нативный)	2966±0,01	3294±0,07	415±0,14	396±0,21
Антиген 2 ГП Н7Н1 ЭЭЖ ЭК (нативный)	3251±0,15	2587±0,10	385±0,12	417±0,15
Антиген 3 БН ЭЭЖ ЭК (нативный)	345±0,20	40605±0,12	78±0,30	3187±0,10
Антиген 4 БН + ГП ЭЭЖ ЭК (нативный)	626±0,14	43139±0,20	198±0,07	5197±0,30
Антиген 5 БН - суспензия внутренних органов (нативный)	814±0,08	15679±0,15	81±0,15	2654±0,07
Контроль конъюгата	522±0,05	5588±0,10	95±0,09	816±0,04

Примечание. * – использована рабочая доза конъюгата МКА к нуклеопротеину вирусов ГП и БН, отработанная для колориметрического ТФ ИФА; ** – компоненты из набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики ГП и БН; в таблице приведены средние данные по трем повторам ($n = 3$).

образующейся хемилюминесценции. Учет реакции проводили с помощью детектора – низкошумового фотоумножителя (многоканальный планшетный люминометр LB 960 Centro XS3, “Berthold Technologies”) и выражали в световых единицах RLU. Учет реакции при колориметрическом методе детекции осуществляли с помощью Multiskan MCC 340 (“LabSystems”, Финляндия) при $\lambda = 405$ нм. Реакцию считали положительной и специфичной, если показания оптической плотности (ОП) в лунках с испытуемыми сыворотками (антигеном) превышали показания ОП в лунках с нормальной сывороткой (антигеном) в 2,1 раза и более.

Для постановки ИХА и ТФ ИФА использовали соответственно непрозрачные белые и прозрачные полистироловые 96-луночные планшеты для ИФА (Unifilter и Nunc immunoplate).

Дозу сенсibilизации планшет соответствующими МКА или специфическими антигенами, рабочую дозу специфического или антивидового конъюгатов определяли методом перекрестного (шахматного) титрования.

Для выявления специфических антител использовали гипериммунные сыворотки крови кур (SS) против ГП, БН и ИББ, а также пробы сыворотки крови от домашней птицы Можайского района Московской области, привитой инактивированной вакциной (Покровский завод биопрепаратов) против ГП подтипа Н5 (S Н5), и пробы сыворотки крови птиц, присланные из различных регионов Российской Федерации для мониторинговых исследований в ФГБУ ЦНМВЛ (SS); сыворотку специфическую (SS) свиней к Н5Н1; сыворотку специфическую (SS) свиней к вирусу классической чумы свиней (КЧС).

Относительное содержание специфических антител в сыворотках крови животных выражали в международных ИФА-единицах EU и определяли по формуле:

$$EU = [(\sum ОП \text{ пробы} - \sum ОП К) / (\sum ОП \text{ стандарт} - \sum ОП К)] \cdot 100,$$

где $\sum ОП$ – сумма значений ОП при определенной длине волны в зависимости от субстрата; ОП К – ОП отрицательного контроля; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка.

$$EU = [(\sum RLU \text{ пробы} - \sum RLU К) / (\sum RLU \text{ стандарт} - \sum RLU К)] \cdot 100,$$

где $\sum RLU$ – сумма значений световых единиц; RLU К – RLU отрицательного контроля; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка.

Результаты и обсуждение

Изучена возможность применения в аналитической практике катионной пероксидазы хрена в ИФА с хемилюминесцентной детекцией.

Результаты исследований по выявлению специфических

антигенов вирусов ГП и БН в ДАС ТФ ИФА представлены в табл. 1. Они свидетельствуют о том, что ИХА является специфическим чувствительным методом для выявления антигенных детерминант вирусов. Расчет соотношения значений сигнал/фон показал, что при использовании конъюгата в рабочей дозе для ДАС ТФ ИФА с колориметрической детекцией оно составило для вируса гриппа от 2,1 до 5,4. При разведении рабочей дозы конъюгата МКА в 10 раз происходит снижение фоновой реакции и повышение специфического взаимодействия антиген/антитело. Соотношение сигнал/фон увеличилось на порядок и составило 4,4–6,9 и 3,2–8,5 для вируса ГП и БН соответственно.

Для сравнительного изучения чувствительности методов нами была использована ЭЭЖ ЭК, инфицированных вирусом БН штамм Томилинский-53 и вирусом ГП подтипа Н5 (A/tern/South Africa/61/ Н5Н3) с исходным титром инфекционной активности 8,5 lg ЭЛД_{50/см³}. В табл. 2 показаны результаты выявления антигенов нуклеопротеина вирусов методом ДАС ТФ ИФА при колориметрическом и хемилюминесцентном методах детекции.

Полученные данные указывают на то, что ИФА с хемилюминесцентной детекцией позволяет выявлять специфический антиген как вируса ГП, так и вируса БН в разведении пробы до 10⁻⁷, что на порядок выше, чем при колориметрическом методе детекции, т. е. методом ИХА можно выявлять инфицированный материал с титром инфекционной активности 1–1,5 lg ЭЛД_{50/см³} и выше.

Сравнительное изучение чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА с колориметрической детекцией и ИХА для выявления специфических антител

В опыте по обработке оптимальных параметров по-

Таблица 2

Сравнительная чувствительность ДАС ТФ ИФА при различных методах детекции

Разведение пробы	ТФ ИФА ОП ₄₀₅ , колориметрический метод детекции		ИХА, RLU-1000	
	ГП	БН	ГП	БН
10 ⁻²	0,554±0,02	0,678±0,07	797±0,01	16640±0,04
10 ⁻³	0,421±0,05	0,541±0,04	574±0,02	15760±0,07
10 ⁻⁴	0,401±0,01	0,403±0,02	538±0,05	14439±0,03
10 ⁻⁵	0,321±0,06	0,379±0,01	439±0,06	13398±0,04
10 ⁻⁶	0,327±0,04	0,307±0,04	351±0,1	12685±0,01
10 ⁻⁷	0,203±0,02	0,167±0,03	332±0,05	7326±0,04
10 ⁻⁸	0,158±0,04	0,150±0,05	101±0,2	5589±0,02
Контроль конъюгата	0,146±0,03	0,152±0,05	95±0,09	3236±0,04

Таблица 3

Чувствительность и специфичность непрямого ТФ ИФА и ИХА при колориметрическом и хемилюминесцентном методах детекции для выявления антител к вирусу ГП и БН в сыворотках крови птиц

Сыворотка	Метод детекции: ОП и хемилюминесцентного свечения Sag/Nag		Относительное содержание антител, ИФА-единицы EU	
	ТФ ИФА ОП ₄₀₅	ИХА RLU-1000	ТФ ИФА	ИХА
Нормальная сыворотка NS	0,152	6,0	0	0
SS стандарт к ГП "Авивак"	0,691/0,18**	44,7/13,4	100	100
Сыворотка к ИББ	0,208	10,3	0	0
Сыворотка к ГП	0,49/0,2	42,1/9,8	69	65
Сыворотка штамма Ла-Сота БН	0,6*/0,13	69,7*/11	90	91
Контроль конъюгата анти-IgG кур	0,16	9,5	0	0

Примечание. * – реакция с антигеном вируса БН; $p \leq 0,05$; ** – в числителе ОП со специфическим антигеном, в знаменателе – с нормальным антигеном; Sag – специфический антиген; Nag – отрицательный антиген.

становки непрямого ТФ ИФА с колориметрической детекцией и ИХА для выявления специфических антител использовали гипериммунные сыворотки крови кур против ГП, БН, ИББ; компоненты коммерческого набора для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак». Сыворотки ис-

следовали в одном разведении 1:800, т. е. в 4 раза превышающем разведение отрицательной контрольной сыворотки (1:150–1:200), имеющей ОП₄₀₅, равную фоновому уровню антивидового пероксидазного конъюгата (анти-IgG кур).

Результаты сравнительного изучения чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА и ИХА представлены в табл. 3. Они свидетельствуют о том, что используемые методы выявления антител чувствительны и специфичны. Результаты расчета относительного содержания в сыворотках крови антител в EU ИФА практически совпадают.

В дальнейшем нами проведено сравнительное изучение чувствительности и специфичности различных форматов ИФА, разработанных для выявления специфических антител. С использованием методов ТФ ИФА (непрямой и конкурентный) были исследованы 334 пробы сывороток крови от домашней птицы, привитой против ГП подтипа H5, и пробы сывороток крови от диких птиц, присланные для мониторинговых исследований в ФГБУ ЦНМВЛ. Для контроля специфичности антигена, адсорбированного на полистироле, использовали конъюгаты МКА 5C10 к нуклеопротеину вируса ГП и 3G4 к вирусу БН. На каждом планшете ставили контроль заведомо положительной и отрицательной сыворотки в 4 повторях, исследуемых сывороток в 2 повторях. Результаты представлены в табл. 4.

Результаты ИХА совпадали с результатами ТФ ИФА с колориметрической детекцией и РТГА. Исследования показали, что по чувствительности и специфичности раз-

Таблица 4

Чувствительность и специфичность различных методов выявления антител к вирусу ГП и БН в сыворотках крови животных

Сыворотка и МКА	Значения ОП в					РТГА, ГАЕ/см ³	Относительное содержание АТ в ТФ ИФА/ИХА, EU
	непрямом ТФ ИФА		конкурентном ТФ ИФА				
	антиген						
	ЭЭЖ ЭК (грипп А)			Rek NP (грипп А)			
нИХА, RLU-1000	нТФ ИФА, ОП405	нТФ ИФА, ОП405 (из набора "Авивак")	нТФ ИФА, ОП405	ТФ ИФА, ОП405			
SS к ГП, стандарт [#]	54,7	0,736	0,691	1,200	0,04	512	100
Конъюгат МКА 5C10 ^{##}	–	0,700	0,600	0,600	0,070	–	–
Конъюгат анти-IgG кур [#]	9,5	0,160	0,100	0,100	–	–	–
SS ГП (гипериммунная)	49,1	0,642	0,490	1,500	0,070	512	84/87
Алтайский край** – пробы от дикой птицы (мониторинг UG типа А подтипа H5)							
S 1.28	44,6	0,684	0,514	0,934	0,080	2048	73/81
S 1.16	44,4	0,583	0,475	0,980	0,050	1024	73/73
S 1.19	42,3	0,452	0,382	0,600	0,100	512	68/51
Можайский район Московской области** – пробы от вакцинированной птицы против ГП типа А подтипа H5N1							
S H5-1	29,9	0,200	0,173	0,100	0,510	0	45/10
S H5-30	26,8	0,138	0,182	0,300	0,570	0	37/10
S H5-9	27,8	0,140	0,163	0,180	0,550	0	35/10
S H5-8	28,8	0,162	0,13	0,190	0,512	0	37/20
S H5-2.3	46,8	0,979	0,935	1,600	0,040	2048	82/95
S H5-с. Бородино	69,7	0,712	0,597	1,800	0,040	1024–2048	120/94
S H5-с. Иващино	55,8	0,674	0,583	1,300	0,060	1024–2048	100/88
S H5-Троицк	48,3	0,592	0,504	1,000	0,070	512–1024	85/74
S H5-с. Голеново	46,2	0,624	0,603	1,200	0,050	512–1024	81/80
Конъюгат МКА 3G4 ^{##}	–	0,639	0,150	0,050	–	–	–
SS БН* (гипериммунная)	69,7	0,600	0,130	0,140	0,620	1024	–
SS свиней к H5N1***	57,3	0,594	н/и	1,400	0,060	1024	100/80
SS ИББ	10,5	0,140	0,208	0,120	0,500	0	0
SS свиней к вирусу КЧС***	25,2	0,230	0,09	0,130	0,583	0	30/10

Примечание. * – в реакциях использовали антиген вируса БН; ** – показаны результаты исследования объединенных проб отрицательных сывороток и положительных в РТГА, имеющих титр в пределах 512–2048; *** – для выявления комплекса антиген – антитело использовали конъюгат протеина G; # – компоненты набора для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак»; ## – компоненты набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики ГП и БН методом ТИФА.

работанные методы ИФА не уступают коммерческому набору для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц НПП «Авивак». Применение рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А в качестве специфического антигена в непрямом ТФ ИФА ведет к снижению фонового уровня, увеличению в 1,5–2 раза чувствительности и специфичности метода. Соотношение сигнал/фон выше в случае использования рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А даже для самых низких значений ОП₄₀₅: «Авивак» – 2,4–8,4; непрямой ТИФА – 2,1–6,9; непрямой ТИФА на основе рекомбинантного белка – 3,3–17.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что определение пероксидазной метки с помощью усиленной хемилюминесценции отличается высокой чувствительностью, специфичностью и может быть положено в основу разработки удобных и быстрых методов ИФА.

ИХА может быть рекомендован для диагностики инфекционных болезней как высокочувствительный и специфичный метод. Его явное преимущество заключается в простоте использования, полной автоматизации, использовании высококачественных стандартизованных реагентов. Этот метод отличается высокой чувствительностью (белки определяются в пикограммовых количествах), низким уровнем фоновой реакции с неспецифическим антигеном при детектируемом уровне реакции со специфическим антигеном, экономичностью: требуется минимальное количество МКА.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–8, 10 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К. Новые и возвращающиеся инфекции – дремлющий вулкан. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 2 (96): 5–8.
2. Силко Н.Ю., Глушченко Ю.Г., Шестопалова Л.В., Юрченко К.С. Биологические свойства велегенных штаммов вируса болезни

Ньюкасла, изолированных от птиц на Северном Кавказе. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (1): 45–8.

9. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях. *Соросовский образовательный журнал*. 2001; 7 (1): 16–23.

REFERENCES

1. L'vov D.K. New and emerging infections – a dormant volcano. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 2 (96): 5–8. (in Russian)
2. Silko N.Yu., Glushchenko Yu.G., Shestopalova L.V., Yurchenko K.S. Biological properties velegenny strains of Newcastle disease virus isolated from birds in the Northern Caucasus. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (1): 45–8. (in Russian)
3. Umali D.V., Ito H., Suzuki T., Shiota K., Katoh H., Ito T. Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non-epidemic areas of Japan. *Virology*. 2013; 10:330.
4. Aldous E.W., Mynn J.K., Banks J., Alexander D.J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol*. 2003; 32 (3): 239–56.
5. Fiore A.E., Shay D.K., Broder K., Iskander J.K., Uyeki T.M., Mootrey G. et al. Prevention and control of influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm. Rep*. 2008; 57 (RR-7): 1–60.
6. Naffakh N., Tomoiu A., Rameix-Welti M.A., van der Werf S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu. Rev. Microbiol*. 2008; 62: 403–24.
7. Peiris J.S., Tu W.W., Yen H.L. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *Eur. J. Immunol*. 2009; 39: 2946–54.
8. O.I.E. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. Paris; 2008.
9. Vladimirov Yu.A. Activated Chemiluminescence and bioluminescence as a tool in biomedical research. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*. 2001; 7 (1): 16–23. (in Russian)
10. Barnard G.J.R., Kim J.B., Williams J.L. *Alternative Immunoassays*. New York; 1985: 123–52.

Поступила 24.03.14

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 617.7-002-022:578.825.11]-078

Слепова О.С.¹, Светлова Е.В.¹, Ковалева Л.А.¹, Макаров П.В.¹, Кузусева А.Э.¹, Денисова Е.В.¹, Вахова Е.С.¹, Захарова Г.Ю.¹, Кондратьева Ю.А.¹, Андрушин А.Е.¹, Демкин В.В.²

Исследования вируса герпеса человека 6-го типа и других герпес-вирусов, вызывающих заболевания глаз, методом полимеразной цепной реакции

¹ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва; ²Институт молекулярной генетики РАН, 123182, г. Москва

С целью изучения роли вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) в развитии заболеваний глаз проведено ПЦР-исследование крови (152), биоптатов роговицы (61) и внутриглазных жидкостей (11) на ВГЧ-6 и другие вирусы группы герпеса: вирус простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр. Установлено, что ДНК ВГЧ-6 наряду с другими представителями семейства Herpesviridae может выявляться как в крови, так и непосредственно в тканях и жидкостях глаза у пациентов с различными клиническими формами офтальмопатологии (всего обследовано 174 человека). Полученные данные позволяют считать ВГЧ-6 одной из возможных причин офтальмогерпеса и делают поиск ДНК этого вируса неотъемлемым этапом на пути постановки этиологического диагноза офтальмологическим больным.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирус герпеса человека 6-го типа; заболевания глаз; роговица; кровь; полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (4): 45–48.

Для корреспонденции: Слепова Ольга Семеновна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. иммунологии и вирусологии; e-mail: slepowaolga@yandex.ru