

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-002-022-078.33:006

Дьяррассуба А., Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТИТА E

ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, Москва, Российская Федерация

Целью данного исследования являлось создание подходов к стандартизации лабораторной диагностики гепатита E. Нами были выполнены три ключевых этапа стандартизации — определение аналитической чувствительности молекулярного теста для выявления РНК вируса гепатита E (ВГЕ); определение аналитической чувствительности в Международных единицах ИФА-теста, широко применяемого в России для выявления анти-ВГЕ; и создание отечественного референсного материала — стандарта анти-ВГЕ IgG, валидированного относительно Международного стандарта. В результате проведенных исследований получены инструменты для стандартизации лабораторной диагностики гепатита E и эпидемиологического надзора за данной инфекцией — молекулярный тест для выявления РНК ВГЕ с чувствительностью в диапазоне 125—250 МЕ/мл, данные по аналитической чувствительности коммерческого ИФА-теста для выявления анти-ВГЕ (0,25 МЕ/мл) и отечественный стандарт анти-ВГЕ концентрацией 5 МЕ/мл.

Ключевые слова: гепатит E; иммуноферментный анализ; Международный стандарт ВОЗ.

Для цитирования: Дьяррассуба А., Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Стандартизация диагностики гепатита E. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (5): 299-303

DOI 10.18821/0869-2084-2016-5-299-303

Diarrassouba A., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.

THE STANDARDIZATION OF DIAGNOSTIC OF HEPATITIS E

The M.P. Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis, 142784 Moscow, Russia

The study was carried out to develop approaches to standardization of laboratory diagnostic of hepatitis E. The three stages of standardization are establishment of analytical sensitivity of molecular test for detection of RNA of virus of hepatitis E; establishment of analytical sensitivity in International Units of enzyme-linked immunosorbent assay testing widely applied in Russia for detection of anti-virus of hepatitis E; And development of national reference material - standard anti-virus of hepatitis E IgG validated relatively to International standard. The results of study permitted to develop tools for standardizing of laboratory diagnostic of hepatitis E and epidemiological control of the given function - molecular test for detecting RNA of virus of hepatitis E with sensitivity within range of 1250250 IU/ml, data concerning analytical sensitivity of commercial enzyme-linked immunosorbent assay testing for detecting anti-virus of hepatitis E (0.25 IU/ml) and national standard of anti-virus of hepatitis E with concentration of 5 IU/ml.

Key words: hepatitis E; enzyme-linked immunosorbent assay; WHO international standard

For citation: Diarrassouba A., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. The standardization of diagnostic of hepatitis E. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5): 299-303. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-299-303

For correspondence: Kyuregyan K.K., doctor of biological sciences, head of laboratory of viral hepatitis. e-mail: kyurgyan@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

The project was implemented under financial support of the Minobrnauka of Russia, unique identifier of the project RFMEF160414X0064.

Received 10.12.15
Accepted 15.12.15

Введение. Гепатит E (ГЕ) является вирусной инфекцией, широко распространенной в странах тропического пояса, где по сути занимает экологическую нишу гепатита A (ГА), вызывая вспышки и спорадические случаи заболевания преимущественно среди молодых взрослых [1]. Накопление сведений

о циркуляции вируса ГЕ (ВГЕ) и случаях ассоциированного с ним заболевания на территориях, ранее считавшихся эндемичными (страны умеренного климата, в том числе Россия), сделало актуальным надзор за данной инфекцией и включение маркеров ГЕ в систему дифференциальной лабораторной диагностики гепатитов [2]. С 2013 г. ГЕ является официально регистрируемой в России нозологической формой. Основными маркерами ГЕ, применяемыми для его лабораторной диагностики, являются антитела к ВГЕ (анти-ВГЕ) классов IgM и IgG, а также вирусная РНК, выявляемая в образцах кала и/или сыворотки крови у инфицированных лиц. Как правило, период

Для корреспонденции: Кюрегян Карен Каренович, доктор биол. наук, зав. лаб. вирусных гепатитов ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова», e-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru

времени при ГЕ (т. е. присутствие РНК ВГЕ в крови) составляет не более 2 нед на начальных этапах инфекции. Выделение вируса с фекалиями и соответственно обнаружение РНК ВГЕ в кале происходит, как правило, на протяжении всей инфекции [3]. Поэтому с диагностической точки зрения выявление вирусной РНК в образцах фекалий более информативно по сравнению с тестированием образцов сыворотки крови. Выявление анти-ВГЕ IgM свидетельствует об острой или недавно перенесенной ВГЕ-инфекции, тогда как присутствие анти-ВГЕ IgG без антител класса М указывает на перенесенную ранее инфекцию. Считается, что анамнестические анти-ВГЕ IgG сохраняются на протяжении многих лет и обеспечивают пожизненный иммунитет против повторного инфицирования [1].

Выявление анти-ВГЕ и РНК ВГЕ важно не только для адекватной диагностики ГЕ, но и для эпидемиологического надзора за инфекцией. Анти-ВГЕ IgG определяют в сероэпидемиологических исследованиях для оценки широты прослойки лиц, встречавшихся с данным возбудителем. Выявление РНК ВГЕ у заболевших и последующий анализ генетического материала вируса необходимы для установления источников инфекции и возможных путей передачи ВГЕ. Однако проведенный ранее анализ чувствительности и специфичности разных тестов на анти-ВГЕ методом иммуноферментного анализа (ИФА) показал существование значительных различий между диагностическими [4]. Именно эти различия, как считается, являются причиной противоречивых результатов сероэпидемиологических исследований, выполненных на одних и тех же территориях [5]. Аналогичным образом различаются и молекулярные тесты для выявления РНК ВГЕ [6].

Для стандартизации диагностики ГЕ Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) были выпущены два референсных материала — Стандарт анти-ВГЕ, разработанный Национальным институтом биологических стандартов и контролей (NIBSC) [7], и Стандарт РНК ВГЕ, разработанный Институтом Пауля Эрлиха [8]. Целью данной работы являлось определение в международных единицах чувствительности применяемых в России тестов для определения анти-ВГЕ и РНК ВГЕ, а также создание вторичного отечественного стандарта анти-ВГЕ на основе Международного стандарта ВОЗ.

Материал и методы. Определение чувствительности выявления РНК ВГЕ. Для проведения испытаний были использованы следующие материалы:

1. 1-й Международный стандарт ВОЗ для РНК ВГЕ (1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays). PEI code 6329/102. Концентрация РНК ВГЕ $2,5 \cdot 10^6$ МЕ/мл.

2. Экспериментальный образец тест-системы для выявления РНК ВГЕ методом обратной транскрипции (ОТ) — полимеразной цепной реакции (ПЦР). Количество — 1 набор реагентов на 100 определений.

Исходная концентрация стандарта ВОЗ составляла 250 000 МЕ/мл. Для восстановления лиофилизованного стандарта в ампулу вносили 500 мкл воды для ПЦР для получения раствора РНК ВГЕ с концентрацией 250 000 МЕ/мл. Готовили серию разведений стандарта в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с шагом 1 г МЕ/мл в диапазоне концентраций, меняя конечник дозатора на каждом разведении. В результате была получена серия разведений в диапазоне концентраций от 250 000 до 0,25 МЕ/мл. Для получения большего количества точек разведений в диапазоне 250—25 МЕ/мл аналогичным образом готовили дополнительную серию разведений стандарта в стерильном ФСБ с концентрациями 125, 62,5 и 31,25 МЕ/мл.

Для каждого разведения стандарта РНК ВГЕ проводили параллельно выделение нуклеиновых кислот двумя способами — из 50 мкл образца с помощью набора для выделения

ДНК/РНК из сыворотки/плазмы крови (НПО «Литех») и из 400 мкл образца с помощью набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I для применения в автоматизированной системе для выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact System (Roche Diagnostics Ltd.). В каждом выделении в качестве отрицательного контроля использовали ФСБ, которым разводили стандарт. Для каждого разведения определяли РНК ВГЕ в трех повторах методом ОТ — гнездовой ПЦР (ОТ-ПЦР). Выявление РНК ВГЕ проводили методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС 2), кодирующей капсидный белок ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров — 5'-aaytatgcmcagttaccgggtg-3' (прямой) и 5'-cccttatcctgctgagcattctc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5'-gtyatgytytgcatatcgct-3' (прямой) и 5'-agccgacgaaatyaattctgtc-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42°C — 1 ч, затем 5 мин — 94°C (денатурация и инактивация фермента ОТ), затем 35 циклов: 94°C — 30 с, 45°C — 30 с, 72°C — 45 с, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР — 35 циклов: 94°C — 30 с, 45°C — 30 с, 72°C — 45 с, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.

Определение чувствительности теста для выявления анти-ВГЕ IgG. Лиофилизованный стандарт ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) восстанавливали стерильной водой до концентрации 100 ед. в 1 мл (МЕ/мл) в соответствии с инструкцией производителя. Из восстановленного стандарта готовили в стерильной воде серию разведений в диапазоне концентраций от 10 до 0,001 МЕ/мл. Полученные разведения тестировали на анти-ВГЕ IgG методом ИФА с использованием набора реагентов НПО «Диагностические системы» (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G) согласно инструкции производителя. Каждое разведение тестировали в трех повторах. Значения оптической плотности (ОП), полученные при анализе, были статистически обработаны с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

Разработка вторичного стандарта анти-ВГЕ. Для приготовления вторичного стандарта анти-ВГЕ был выбран образец донорской плазмы, положительный по анти-ВГЕ IgG в тесте ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G с высоким значением ОП (более 2,5). Образец был нереактивным в лицензированных тестах на антитела к вирусу гепатита С (ВГС), антитела к ВИЧ, HBsAg, антитела к HBc; негативным по РНК ВИЧ, РНК ВГС, ДНК ВГВ. Содержимое мешка с донорской плазмой центрифугировали в течение 1 ч при 4000 об/мин, отбирали супернатант и делали 500 аликвот объемом 0,5 мл. Из трех аликвот готовили три идентичных серии разведений в стерильной воде: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Каждую серию разведений независимо тестировали на анти-ВГЕ IgG с использованием набора реагентов НПО «Диагностические системы» (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G), согласно инструкции производителя. В каждой постановке ИФА в качестве количественного стандарта использовали разведения стандарта ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) в концентрациях 0,25; 0,5; 1; 5; 10 МЕ/мл. На основании полученной калибровочной кривой в каждом разведении тестируемой серии определяли концентрацию анти-ВГЕ (в МЕ/мл).

Оставшиеся 497 аликвот лиофилизовали. Три лиофилизованных образца восстанавливали стерильной водой до объема 0,5 мл и готовили из них три идентичных серии разведений в стерильной воде: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Каждую серию разведений независимо тестировали на анти-ВГЕ IgG, аналогично образцам до лиофилизации с использованием набора ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G и рассчитыва-

Результат выявления РНК ВГЕ в разведениях первого Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ

Концентрация РНК ВГЕ, МЕ/мл	Результат выявления РНК ВГЕ в ОТ-ПЦР					
	выделение из 50 мкл			выделение из 400 мкл		
	повторы			повторы		
	1	2	3	1	2	3
250 000	+	+	+	+	+	+
25 000	+	+	+	+	+	+
2 500	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+
125	—	—	—	+	+	+
62,5	—	—	—	—	—	—
31,25	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—
2,5	—	—	—	—	—	—
0,25	—	—	—	—	—	—

ли концентрацию анти-ВГЕ в каждом образце относительно калибровочной кривой стандарта ВОЗ.

Полученные значения концентрации анти-ВГЕ по каждому флакону вторичного стандарта до и после лиофилизации сравнивали попарно со значениями, полученными для стандарта ВОЗ, методом параллельных линий с применением дисперсионного анализа, реализованного в виде программного модуля в среде Microsoft Excel.

Результаты. Полученные результаты выявления РНК ВГЕ в серии разведений первого Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ приведены в таблице. По результатам тестирования серии разведений Международного стандарта ВОЗ чувствительность испытуемой тест-системы составила не менее 250 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 50 мкл и не менее 125 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 400 мкл. Для всех трестированных серий разведений были получены идентичные результаты.

На рис. 1 приведены результаты выявления анти-ВГЕ IgG в разведениях стандарта ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584). Положительный результат был получен для образцов с номинальной концентрацией 0,25 МЕ/мл и выше в трех трестированных сериях разведений стандарта ВОЗ. Таким образом, чувствительность выявления анти-ВГЕ IgG в тест-системе ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G оставила 0,25 МЕ/мл.

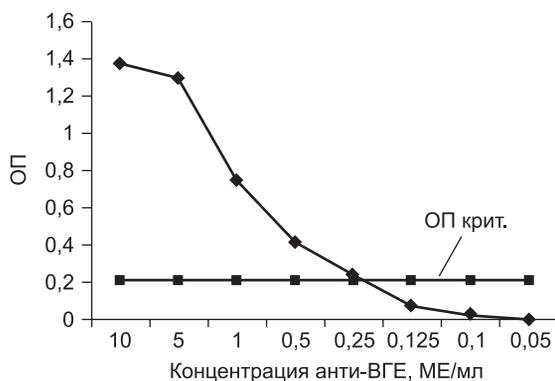


Рис. 1. Результаты выявления анти-ВГЕ IgG в разведениях стандарта ВОЗ.

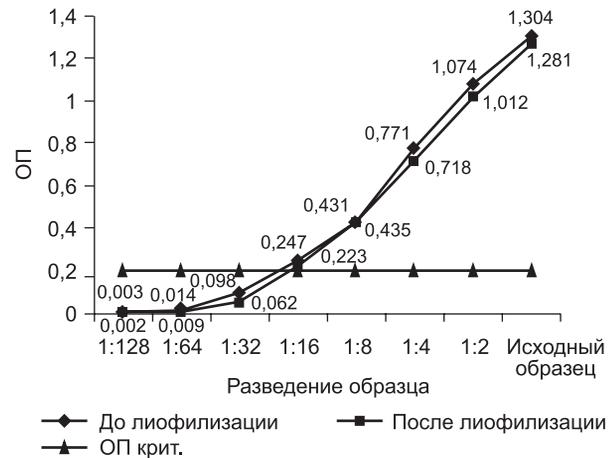


Рис. 2. Значения ОП при определении анти-ВГЕ IgG в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации.

Результаты определения анти-ВГЕ IgG в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации приведены на рис. 2. Разведения до 1:16 включительно дали положительный результат, при этом значения ОП в разведениях, полученных до и после лиофилизации, не имели значимых различий. На рис. 3 приведены значения концентрации анти-ВГЕ в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации, выраженные в МЕ/мл. Для построения калибровочной кривой для расчета значений в МЕ/мл разведений вторичного стандарта были использованы значения ОП, полученные в той же постановке ИФА для Международного стандарта ВОЗ. Концентрация анти-ВГЕ в разработанном вторичном стандарте составила 5 МЕ/мл. Концентрация анти-ВГЕ, выраженная в МЕ/мл, снижалась в разведениях вторичного стандарта до и после лиофилизации согласованно и не отличалась от линейности снижения концентрации в разведениях Международного стандарта ВОЗ. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии деградации анти-ВГЕ IgG в полученном вторичном стандарте в результате лиофилизации.

Обсуждение. Целью данного исследования являлось создание подходов к стандартизации лабораторной диагностики

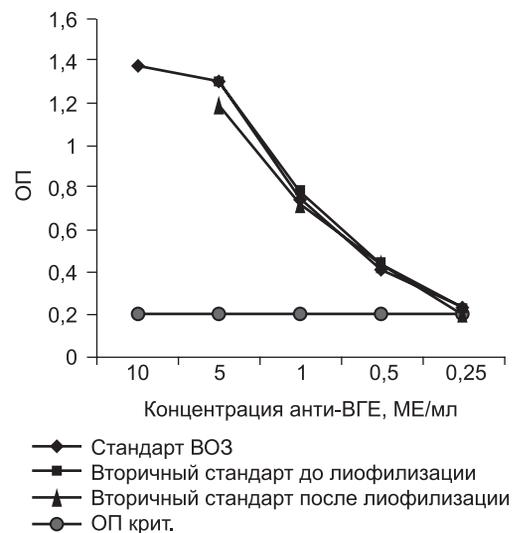


Рис. 3. Концентрация анти-ВГЕ IgG во вторичном стандарте, рассчитанная в МЕ/мл относительно Международного стандарта ВОЗ.

ГЕ. Нами были выполнены 3 ключевых этапа стандартизации — определение аналитической чувствительности молекулярного теста для выявления РНК ВГЕ; определение аналитической чувствительности в международных единицах ИФА-теста, широко применяемого в России для выявления анти-ВГЕ; создание отечественного референсного материала — стандарта анти-ВГЕ IgG, валидированного относительно Международного стандарта. На первом этапе исследования нами проведена валидация ПЦР-системы для детекции РНК ВГЕ относительно Международного стандарта ВОЗ. Специфичность данной системы и ее способность выявлять разные генотипы ВГЕ была описана ранее [9]. Применение серии разведений первого Международного стандарта ВОЗ для РНК ВГЕ позволило определить аналитическую чувствительность разработанной нами тест-системы для выявления РНК ВГЕ и установить четкую зависимость чувствительности детекции от объема анализируемого образца. Чувствительность выявления РНК ВГЕ составила не менее 250 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 50 мкл и не менее 125 МЕ/мл при выделении РНК из образца объемом 400 мкл. Полученные для данной тест-системы показатели чувствительности равны или превышают аналогичные показатели, описанные в литературе. Так, по данным A. Girón-Callejas и соавт. [10], чувствительность теста для выявления РНК ВГЕ, основанного на ПЦР в реальном времени с праймерами к участку перекрытия открытых рамок 2 и 3 генома ВГЕ, составляет 250 МЕ/мл при анализе образцов объемом 200 мкл. Очевидно, более высокая чувствительность выявления РНК ВГЕ может достигаться, как в нашем случае, применением гнездовой ПЦР с двумя парами праймеров, а также выделением РНК из образцов большего объема.

Вторым этапом исследования являлось определение аналитической чувствительности определения анти-ВГЕ IgG методом ИФА. Вопрос чувствительности применяемых для выявления анти-ВГЕ коммерческих тест-систем важен не только с точки зрения диагностики гепатита Е, но и для сероэпидемиологических исследований, в основе которых лежит определение доли серопозитивных лиц в той или иной когорте. При изучении эпидемиологии ГЕ описаны противоречия в данных по частоте выявления анти-ВГЕ на одних и тех же территориях, которые связывают с различиями в чувствительности применяемых тестов [5]. Для определения чувствительности, выраженной в международных единицах в 1 мл нами была выбрана тест-система производства НПО «Диагностические системы» (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G), поскольку для аналогичной тест-системы того же производителя для детекции анти-ВГЕ класса IgM ранее была подтверждена высокая специфичность и чувствительность при проведении сравнительных испытаний нескольких тест-систем с помощью панелей образцов, содержащих антитела к ВГЕ всех четырех генотипов, а также образцов, полученных от здоровых лиц и пациентов с ГЕ и ГА [11]. Полученные результаты показали, что аналитическая чувствительность выявления анти-ВГЕ IgG в испытуемой тест-системе составляет не менее 0,25 МЕ/мл. Этот показатель идентичен чувствительности теста, широко применяемого за рубежом (Wantai (PE2) HEV IgG EIA (Fortress Diagnostics, Antrim, Northern Ireland)), и в 10 раз выше чувствительности другого теста (2,5 МЕ/мл для системы Genelabs (GL) HEV IgG EIA (Genelabs, Inc., Singapore)) [12]. Таким образом, отечественная тест-система для выявления анти-ВГЕ, с помощью которой несколькими группами исследователей были получены данные по сероэпидемиологии ГЕ в России [13, 14], обладает одним из наиболее высоких показателей аналитической чувствительности среди существующих в мире тестов.

Создание национальных референсных материалов для контроля качества проведения лабораторных исследований является важнейшей задачей для оптимизации диагностики инфекционных заболеваний. Диагностика ГЕ не является исключением. Нами был разработан стандартный образец

анти-ВГЕ IgG, валидированный относительно Международного стандарта ВОЗ (NIBSC code: 95/584). Полученный вторичный стандарт представляет собой лиофилизированную донорскую плазму, негативную по маркерам ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, и имеет концентрацию анти-ВГЕ, равную 5 МЕ/мл. Тестирование разведений данного стандарта показало линейность результатов определения анти-ВГЕ, совпадающую с линейностью результатов тестирования Международного стандарта ВОЗ. Таким образом, полученный вторичный стандарт анти-ВГЕ может применяться для оценки аналитической чувствительности выполняемых исследований и выражения полученных результатов в МЕ/мл.

Заключение. В результате проведенных исследований получены инструменты для стандартизации лабораторной диагностики ГЕ и эпидемиологического надзора за данной инфекцией — молекулярный тест для выявления РНК ВГЕ с чувствительностью в диапазоне 125—250 МЕ/мл, данные по аналитической чувствительности коммерческого ИФА-теста для выявления анти-ВГЕ и отечественный стандарт анти-ВГЕ с концентрацией 5 МЕ/мл.

Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальнейший идентификатор проекта RFMEFI60414X0064.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3—8, 10—12 см. REFERENCES)

2. Михайлов М.И., Шахгильдян И.В., Онищенко Г.Г. *Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика)*. М.: ВУНМЦ Росздрава; 2007.
9. Солонин С.А. *Циркуляция вируса гепатита Е среди свиней на территории Российской Федерации*. Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2010.
13. Быстрова Т.Н., Полянина А.В., Княгина О.Н. Качественные и количественные параметры эпидемического процесса гепатит Е-инфекции на территории Среднеевропейского региона России. *Мир вирусных гепатитов*. 2010; (1): 9—13.
14. Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Исаева О.В., Белякова В.В., Майорова О.А., Щибрик Е.В. и др. Распространенность маркеров гепатита Е среди доноров крови в регионах Российской Федерации. *Гематология и трансфузиология*. 2013; 58(4): 26—8.

Поступила 10.12.15

REFERENCES

1. Emerson S.U., Purcell R.H. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2003; 13: 145—54.
2. Mikhaylov M.I., Shakhgil'dyan I.V., Onishchenko G.G. *Enterale Viral Hepatitis (etiology, epidemiology, diagnostics and prophylaxis) [Enterale nye virusnye gepatity (etiologiya, epidemiologiya, diagnostika, profilaktika)]*. Moscow: VUNMTs Roszdrava; 2007. (in Russian)
3. Aggarwal R., Kini D., Sofat S., Naik S.R., Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*. 2000; 356 (9235): 1081—2.
4. Herremans M., Bakker J., Duijzer E., Vennema H., Koopmans M.P. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14(5): 562—8.
5. Khudyakov Y., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84—92.
6. Baylis S.A., Hanschmann K.M., Blümel J., Nübling C.M., HEV Collaborative Study Group. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin. Microbiol.* 2011; 49(4): 1234—9.
7. WHO Reference Reagent. WHO Reference Reagent for hepatitis E virus antibody, human serum NIBSC code: 95/584. Instructions for use (Version 3.0, Dated 26/02/2008). Geneva; 2008.

8. 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays PEI code 6329/10 (Version 1.0, 7th July 2011). Geneva; 2011.
9. Solonin S.A. *Hepatitis E Virus Circulation among Pigs in Russian Federation*: Diss. Moscow; 2010. (in Russian)
10. Girón-Callejas A., Clark G., Irving W.L., McClure C.P. In silico and in vitro interrogation of a widely used HEV RT-qPCR assay for detection of the species Orthohepevirus A. *J. Virol. Methods*. 2015; 214: 25—8.
11. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G., Greene-Montfort T., Khudyakova N., Dimitrova Z. et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(3): e24—7.
12. Bendall R., Ellis V., Ijaz S., Ali R., Dalton H.J. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *Med. Virol.* 2010; 82(5): 799—805.
13. Bystrova T.N., Polyana A.V., Knyagina O.N. Qualitative and quantitative parameters of epidemic process of hepatitis E virus infection in Central-European region of Russia. *Mir virusnykh gepatitov*. 2010; (1): 9—13. (in Russian)
14. Potemkin I.A., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V., Belyakova V.V., Mayorova O.A., Shchibrik E.V. et al. Prevalence of hepatitis E markers in blood donors in different regions of Russian Federation. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2013; 58(4): 26—8. (in Russian)

Received 10.12.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.932-078.33

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону

Отработаны оптимальные режимы постановки прямого варианта планшетного иммуноферментного анализа и дот-иммуноанализа с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспрессного выявления холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения. Прямой метод ИФА в планшетном варианте сокращает время анализа до 70—80 мин, а в случае дот-ИФА на мембране — до 70—90 мин. Установлено, что при проведении анализа в условиях комнатной температуры (20—25°C) чувствительность методов остается на исходном уровне.

Ключевые слова: холерный вибрион, моноклональные антитела, пероксидазные конъюгаты, прямой твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ.

Для цитирования: Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (5): 303-307. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretentchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S.

THE IMMUNE-ENZYME TECHNIQUES OF ANALYSIS IN DIAGNOSTIC OF CHOLERA

The Rostov-on-Don research anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The optimal conditions of arrangement of direct alternative of flatbed enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunoanalysis with application of monoclonal peroxidase conjugates for express identification of comma bacillus of serogroups O1 and O139 both in hospital and field conditions without device support. The direct technique enzyme-linked immunosorbent assay in flatbed alternative shortens time of analysis up to 70-80 minutes and in case of dot enzyme-linked immunosorbent assay on membrane - up to 70-90 minutes. It is established that in case of analysis in conditions of room temperature (20-25 oC) sensitivity of techniques remains at initial level.

Keywords: *comma bacillus; monoclonal antibodies; peroxidase conjugates; direct solid-phase immunoenzyme analysis; dot-immunoanalysis.*

For citation: Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretentchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S. The immune-enzyme techniques of analysis in diagnostic of cholera. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5): 303-307. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

For correspondence: *Evdokimova V.V., research worker of laboratory of hybrids. e-mail: nika-evd@yandex.ru*

Information about authors:

*Alekseeva L.P., alekseeva_lp@antiplague.ru
Kruglikov V.D., kruglikov_vd@antiplague.ru
Arkhangelskaya I.V., arhangelskaya_id@antiplague.ru*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Financing. *The study had no sponsor support*

Received 02.09.2015
Accepted 15.12.2015

Для корреспонденции: Евдокимова Вероника Вячеславовна, науч. сотр. лаборатории гибридов ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, e-mail: nika-evd@yandex.ru