

5. Dement'eva I.I., Charnaya M.A., Moroz Yu.A. *Haemostasis System at Heart Operations and the Main Vessels [Sistema gemostaza pri operatsiyakh na serdtshe i magistral'nykh sosudakh]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
6. Vavilova T.V. *Haemostasiologiya in Clinical Practice: a Grant for Doctors [Gemostaziologiya v klinicheskoy praktike: posobie dlya vrachey]*. St. Petersburg: Sankt-Peterburgskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet imeni akademika I.P. Pavlova; 2005. (in Russian)
7. Toh C.H., Hoots W.K.; SSC on Disseminated Intravascular Coagulation of the ISTH. The scoring system of the Scientific and Standardization Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(3): 604—6.
8. Warkentin T.E., Maurer B.T., Aster R.H. Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(25): 2653—4
9. Levi M. Disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med.* 2007; 35(9): 2191—5.
10. Linkins L.A., Dans A.L., Moores L.K., Bona R., Davidson B.L., Schulman S. et al. Treatment and Prevention Heparin-Induced Thrombocytopenia. Antithrombotic Therapy and prevention of Thrombosis, 9<sup>th</sup> ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012; 141(Suppl.2): 495—50.
11. Lobo B., Finch C., Howard A., Minhas S. Fondaparinux for the treatment of patients with acute heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 2008; 99(1): 208—14.
12. Rota E., Bazzan M., Fantino G. Fondaparinux-related thrombocytopenia in a previous low-molecular-weight heparin (LMWH)-induced heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb. Haemost.* 2008; 99(4): 779—81.
13. Summerhayes R.G., Newall F., Monagle P., Ignjatovic V. An automated anti- $\text{IIa}$  assay to measure UFH levels in plasma — a method without exogenous antithrombin. *Int. J. Lab. Haematol.* 2010; 32(20): 268—70.
14. Katayev A., Balciza C., Seccombe D.W. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way? *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133: 180—6.
15. Horowitz G.L. Estimating reference intervals. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(2): 175—7.
16. Bertholf R.L. Statistical methods for establishing and validating reference intervals. *Lab. Med.* 2006; 37(5): 306—10.
17. Bolann B.J. Easy verification of clinical chemistry reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(11): e279—81.
18. Dolgov V.V., Svirin V.P. *Laboratory Diagnostics of Violations of an Haemostasis [Laboratornaya diagnostika narusheniy gemostaza]*. Tver': Triada; 2005. (in Russian)
19. Kishkun A.A. *Guide to Laboratory Methods of Diagnostics [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]*. Moscow: GEOTAR—Media; 2007. (in Russian)
20. Alan G.B. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Test [Klinicheskoe rukovodstvo Titsa po laboratornym testam]*. Moscow: Labora; 2013. (in Russian)

Received 09.01.16

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.832.1.083.3

Петрова Е.Р., Кривицкая В.З., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Майорова В.Г., Тимошичева Т.А., Сомнина А.А.

### РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА СУБТИПОВ А(Н2), А(Н5), А(Н7) И А(Н9)

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава Российской Федерации, 197376, Санкт-Петербург

*Цель работы:* разработка диагностических тест-систем, сконструированных по принципу «сэндвич» ИФА, для детекции антигенов вирусов гриппа, обладающих пандемическим потенциалом: А(Н2), А(Н5), А(Н7) и А(Н9).

Получены и охарактеризованы панели субтипоспецифичных моноклональных антител (МКА), взаимодействующих с молекулой гемагглютинина потенциально пандемических вирусов гриппа. Для вирусов каждого субтипа были подобраны пары МКА/конъюгат МКА с пероксидазой хрена, наиболее эффективно взаимодействующие с вирусом-иммуногеном и не обладающие неспецифической активностью по отношению к вирусам гриппа гетерологичных субтипов. С учетом установленных пороговых значений чувствительность тест-систем варьировала в зависимости от субтипа и штамма вирусов в пределах 4—30 нг/мл при оценке вирусных очищенных концентратов и 0,3—8 гемагглютинирующих единиц при анализе вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Специфичность ИФТС проявилась в отсутствии неспецифических взаимодействий с гетерологичными вирусами, как сезонными, так и потенциально пандемическими.

Метод может быть использован для быстрой идентификации вирусов гриппа, нетипизируемых при рутинной работе практических лабораторий.

**Ключевые слова:** иммуноферментные тест-системы; детекция антигенов; потенциально пандемические вирусы гриппа А(Н2), А(Н5), А(Н7), А(Н9); субтипоспецифичные моноклональные антитела.

**Для цитирования:** Петрова Е.Р., Кривицкая В.З., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Майорова В.Г., Тимошичева Т.А., Сомнина А.А. Разработка иммуноферментных тест-систем для детекции потенциально пандемических вирусов гриппа субтипов А(Н2), А(Н5), А(Н7) и А(Н9). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (7): 432-438. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-7-432-438

**Для корреспонденции:** Кривицкая Вера Зорьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава Российской Федерации, 197376, Санкт-Петербург; e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Petrova E.R., Krivitskaya V.Z., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Maiorova V.G., Timoshitcheva T.A., Sominina A.A.

THE DEVELOPMENT OF IMMUNE ENZYME TEST-SYSTEMS FOR DETECTING POTENTIALLY PANDEMIC INFLUENZA VIRUSES SUBTYPE A(H2), A(H5), A(H7) AND A(H9)

The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, 197376 St. Petersburg, Russia

*Purpose of study.* To develop diagnostic test-systems constructed according principle of "sandwich" enzyme-linked immunosorbent assay to detect antigens of influenza viruses with pandemic potential: A(H2), A(H5), A(H7), A(H9). The panels of subtype-specific monoclonal antibodies interacting with molecule of hemagglutinin of potentially pandemic viruses of influenza are obtained and characterized. The viruses of every sub-type were supplied with selected pairs monoclonal antibodies/monoclonal antibodies' conjugate with peroxidase of horse-radish, interacting most effectively with virus-immunogen and lacking non-specific activity related to influenza viruses of heterologic types. Considering established threshold values, the sensitivity of test-systems varied depending on sub-type and strain of viruses within limits of 4 - 30 ng/ml at evaluation of viral purified concentrates and 0.3 - 8 hemagglutinin units at analysis of virus-containing allantoic fluid. The specificity of immune-enzyme test-system manifested in conditions of absence of non-specific interactions with both seasonal and potentially pandemic heterologic viruses. The technique can be applied for fast identification of viruses of influenza non-typeable in conditions of routine functioning of practical laboratories.

**Key words:** immune enzyme test-system; detection of antigen; potentially pandemic viruses of influenza A(H2), A(H5), A(H7), A(H9); subtype-specific monoclonal antibodies

**For citation:** Petrova E.R., Krivitskaya V.Z., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Maiorova V.G., Timoshitcheva T.A., Sominina A.A. The development of immune enzyme test-systems for detecting potentially pandemic influenza viruses subtype A(H2), A(H5), A(H7) and A(H9). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (7): 432-438 (in Russ.)*

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-432-438

**For correspondence:** Krivitskaya V.Z., doctor of biological sciences, leading researcher of laboratory of biotechnology of diagnostic preparations. e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

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

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 7.03.2016  
Accepted 17.04.2016

Главными особенностями вирусов гриппа А являются их многообразие и изменчивость. Основным источником и естественным резервуаром для возникновения новых вариантов вирусов гриппа человека являются вирусы, циркулирующие среди млекопитающих и птиц. При этом существует реальная опасность преодоления межвидового барьера и инфицирования людей. Хотя способность передаваться от человека к человеку у этих возбудителей пока не зарегистрирована, не исключена возможность ее возникновения как следствие адаптации к новому хозяину, что может привести к развитию очередной пандемии ввиду полного отсутствия у населения защитного иммунитета. Одновременная циркуляция адаптированных к человеку сезонных вирусов гриппа и вирусов гриппа животных увеличивает риск возникновения новых реассортантов при двойном инфицировании человека или млекопитающих (свиней) птичьим вирусом гриппа и эпидемическим штаммом (H3N2 или H1N1) [1].

В 1997 г. человечество впервые столкнулось с высокопатогенным вирусом гриппа птичьего происхождения А(H5N1). Вирус приобрел способность инфицировать людей при прямом контакте с зараженными птицами и вызывать тяжелые респираторные заболевания, в более чем 50% случаев завершившихся летально [2].

Вирусы гриппа субтипов H2, H7 и H9 также считаются потенциально пандемическими, что нашло отражение в «Global influenza preparedness plan» ВОЗ [3].

Низкопатогенные вирусы гриппа А(H7) постоянно и повсеместно циркулируют среди диких птиц. Начиная с 1996 г., единичные случаи инфицирования людей вирусом гриппа А(H7N2), А(H7N3) или А(H7N7) регистрировали в Канаде, США, Великобритании и Нидерландах. Наиболее вероятным источником заражения считались домашние птицы. В большинстве случаев инфекция протекала у пациентов в форме конъюнктивита. Тем не менее в период вспышки в Нидерландах в 2003 г. была обнаружена способность вируса А(H7N7) вызывать тяжелую форму пневмонии с острым респираторным дистресс-синдромом и летальным исходом [4]. В марте

2013 г. в Китае из клинических материалов, полученных от пациентов с тяжелыми респираторными заболеваниями, был выделен реассортантный вирус гриппа А(H7N9) птичьего происхождения [5]. Смертность среди людей, заболевших гриппом А(H7N9), достигала 40% [6]. В модельных экспериментах на животных показана возможность передачи этого вируса воздушно-капельным путем [7].

Контролю за циркуляцией вируса гриппа А(H2N2) уделяется особое внимание. Этот вирус уже становился причиной пандемии 1957 г., но исчез из человеческой популяции в 1968 г. В этой связи люди, родившиеся позднее, не имеют иммунитета к данному патогену [8]. При этом вирусы А(H2) продолжают активно циркулировать среди птиц. В 2013 г. в Китае от домашних уток был выделен новый вариант вируса А(H2N2), который оказался низкопатогенным и не передавался млекопитающим трансмиссивным путем. Однако по сравнению с изолятами животного происхождения предыдущих лет выделения он обладал повышенной аффинностью к рецепторам типа SA a-2,6-Gal, характерным для клеток респираторного тракта человека, что указывает на увеличивающуюся степень адаптации вируса к млекопитающим [9]. Эти факты свидетельствуют о пандемическом потенциале вируса А(H2N2).

Заболевания гриппом А(H9N2) с легким течением впервые были выявлены среди людей в 1999 г. в Гонконге. Спорадические случаи этого заболевания регистрировали в странах Африки и Юго-Восточной Азии в 2013—2015 гг. [10]. Инфицирование людей происходило при прямом контакте с зараженной птицей. На сегодняшний день нет доказательств передачи вируса А(H9N2), как и других вирусов с пандемическим потенциалом, непосредственно от человека к человеку. Тем не менее значительная часть изолятов приобрела способность связываться с «человеческими» рецепторами типа SA a2,6- Gal [11]. Серьезную озабоченность вызывает высокая способность вируса А(H9N2) к реассортации, например, с высокопатогенными вирусами гриппа человека А(H5N1), А(H7N9), А(H3N2) и А(H1N1)pdm09. При этом в

модельных экспериментах показано, что некоторые реассортантные варианты приобретали способность к трансмиссии воздушно-капельным путем [1].

Помимо надзора за заболеваемостью ключевыми элементами плана подготовки к пандемии являются совершенствование и развитие лабораторной диагностики. Использование моноклональных антител (МКА), специфически взаимодействующих с вирусами гриппа строго определенных субтипов, позволяет усовершенствовать диагностические препараты, способствует раннему распознаванию этиологии заболевания, облегчает проведение противоэпидемических мероприятий.

Цель проведенной работы состояла в разработке диагностических ИФА-тест-систем (ИФТС) для детекции в вирус-содержащем материале антигенов вирусов гриппа, обладающих пандемическим потенциалом.

**Материал и методы. Вирусы.** В работе были использованы следующие штаммы вирусов гриппа А, полученные из сотрудничающего референс-центра: A/Singapore/1/57 (H2N2); A/duck/Potsdam/1402-6/86 (H5N2); A/Vietnam/1203/04 (H5N1); A/Indonesia/5/05 (H5N1); A/chicken/Astana/6/05 (H5N1); A/Mallard/Netherlands/12/00 (H7N3); A/Shanghai/2/13 (H7N9); A/Anhui/1/13 (H7N9); A/HongKong/1073/99 (H9N2). Вакцинные штаммы A/17/turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и AA17/California/66/395 (H2N2) были получены из Отдела вирусологии ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург). Вакцинный штамм NIBRG-14 (получен методом обратной генетики и содержит поверхностные гликопротеины вируса A/Vietnam/1194/04 (H5N1)) был передан «National Institute for Biological Standards and Control» (NIBSC, Великобритания).

**Культивирование вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах, получение вирусосодержащей аллантаоисной жидкости.** Вирусы гриппа культивировали в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах, вводя в аллантаоисную полость 1-10 ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл вирусосодержащей аллантаоисной жидкости (ВАЖ). Вирусы A/17/turkey/Turkey/05/133 и A/17/California/66/395 (H2N2) культивировали 48 ч при 32 °С; все остальные штаммы — 48 ч при 37 °С. ВАЖ собирали и проводили контроль гемагглютинирующей активности в реакции гемагглютинации.

**Реакция гемагглютинации (РГА), реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** РГА и РТГА ставили в соответствии с Практическими рекомендациями [12] с использованием диагностикумов производства ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов» (С.-Петербург).

**Очистка и концентрация вирусов гриппа.** Вирусные частицы из ВАЖ осаждали ультрацентрифугированием при 50 000g в течение 2 ч, ресуспендировали в буфере STE (10 мМ трис-ЭДТА, pH 7,2). Очистку вируса проводили ультрацентрифугированием при 100 000 g через градиент 20—60% сахарозы в течение 2,5 ч с последующим осаждением вируса из зоны 36—40% сахарозы при 120 000 g в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в STE. Для измерения концентрации белка в вирусном очищенном концентрате (ОК) использовали набор «BCA™ Protein Assay Kit» («Pierce», США). Полученные ОК хранили до исследования в замороженном состоянии при -75 °С.

**Получение вирусспецифических моноклональных антител.** МКА к вирусам гриппа были получены методом [13] в собственной модификации. Мышей линии BALB/c иммунизировали путем внутрибрюшинного введения вирусных ОК. Мыши были бустированы очищенной фракцией поверхностных гликопротеинов того же вируса. Через 3 дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы

линии X63Ag8.653 в присутствии 50% ПЭГ-2000 с последующим клонированием гибридных клеток методом лимитирующих разведений. Первичное тестирование клонов проводили в непрямом ИФА. В качестве антигенов использовали ОК гомологичных и гетерологичных вирусов. Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ. Стабильные клоны — продуценты МКА использовали для получения асцитных жидкостей. Для этого мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3—5 млн клеток на мышь. Спустя 2—3 нед асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. МКА высаливали насыщенным раствором сульфата аммония.

Работы по получению МКА были выполнены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.03 г.).

**Иммуноблоттинг для оценки антигенной направленности МКА.** Антигенную направленность МКА анализировали методом иммуноблоттинга. Для этого проводили электрофорез вирусных белков в ОК по методу Леммли [14]. Молекулярные массы белков определяли по калибровочной кривой с помощью маркеров (Sigma color burst C1992, «Sigma», США). После ЭФ вирусные белки из геля перенесли на нитроцеллюлозную мембрану (НМ) (0,45 mm, «Bio-Rad», Германия) в буфере для переноса (20 мМ трис, 192 мМ глицин, 20% этанол, pH 8,3). Свободные сайты на мембране блокировали в течение 18 ч 5% бычьим сывороточным альбумином (БСА, «Sigma», США), разведенным 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2, с добавлением 0,05% твина-20 (блокирующий раствор ФСБ-БСА). Инкубацию МКА (в концентрации 5—10 мкг/мл, разведенных ФСБ-БСА) с вирусными антигенами, перенесенными на НМ, проводили при 37 °С в течение 2 ч. После отмывания НМ обрабатывали в течение 2 ч при 37 °С пероксидазным конъюгатом антител к IgG мыши («Sigma», США), разведенным 1/1000 ФСБ-БСА. Окраску полос со связавшимся конъюгатом проводили раствором, содержащим H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) («Life Technologies», США), с последующим определением молекулярной массы окрашенных белков с помощью набора маркеров (Sigma color burst C1992, «Sigma», США).

**Оценка вирусспецифической активности МКА в непрямом варианте ИФА.** Очищенными концентратами гомологичных или гетерологичных вирусов, разведенными карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ), pH 9,5, до концентрации 2 мкг/мл, сенсibilizировали планшеты для ИФА (ОАО «Фирма Медполимер», С.-Петербург) в течение 18 ч при 4 °С. После отмывания несвязавшегося антигенного материала ФСБ с добавлением 0,05% твина-20 (ФСБ-Т), pH 7,2, внесли 10-кратные разведения МКА в ФСБ с добавлением 5% обезжиренного молока (ФСБ-М) до концентраций 5 нг/мл—5 мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С. Связавшиеся с антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазных конъюгатов антител к IgG мыши (Sigma, США) в ФСБ-М (1/5000) в течение 1 ч при 37 °С. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл ТМБ и 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ацетат-цитратном буфере (АЦБ), pH 5,0. После остановки реакции 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> оптическую плотность измеряли на фотометре Anthos-2010 (Австрия) при длине волны 450 нм (OD<sub>450</sub>).

**«Сэндвич-вариант» ИФА.** Иммуноферментные тест-системы (ИФТС) для детекции вирусных антигенов конструировали по принципу «сэндвич-ИФА». На стадии захвата антигенов использовали вирусспецифические МКА (2 мкг/мл в КББ), сенсibilizированные на планшетах для ИФА (ОАО «Фирма Медполимер», С.-Петербург) в течение 18 ч при



4 °С. После отмывания планшетов ФСБ-Т свободные сайты блокировали ФСБ-М в течение 2 ч при 37 °С. На следующем этапе в лунки вносили двукратные разведения вирусосодержащего материала (ОК или ВАЖ) в ФСБ-Т и инкубировали 18 ч при 4 °С. Детекцию вирусов после отмывания планшетов осуществляли с помощью специфичных к гемагглютинирующую МКА, меченных пероксидазой хрена (МКА-Пх), разведенных ФСБ-М до содержания в них МКА 4—10 мкг/мл. Пероксидазную реакцию проявляли, как указано выше для непрямого варианта ИФА.

*Приготовление и оценка активности конъюгатов МКА с пероксидазой хрена (МКА-Пх).* Конъюгацию МКА с Пх осуществляли периодатным методом [15]. Аналитическую активность и специфичность полученных конъюгатов оценивали в ИФА, как указано выше для непрямого варианта метода, при их взаимодействии с ОК вирусосодержащих и гетерологичных вирусов, сенсibilизированных на планшетах для ИФА.

*Оценку вируснейтрализующей активности МКА* проводили в соответствии с методическими рекомендациями [16]. Ингибирование репродукции вирусов гриппа в присутствии МКА учитывали в микрокультуральном ИФА. Для этого использовали пероксидазный конъюгат МКА 6D11 (1/4000 на ФСБ-М), специфичных к NP-белку вирусов гриппа типа А. За нейтрализующий титр МКА принимали их наименьшую концентрацию, при которой наблюдалось не менее чем двукратное снижение  $OD_{450}$  по сравнению с контролем репродукции вируса ( $100 TCD_{50}$ ).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10. Для проверки различий между двумя выборками использовали *U*-критерий Манна—Уитни. Нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости  $p < 0,05$ .

*Результаты.* На первом этапе работ по созданию диагностических тест-систем были получены и охарактеризованы в различных иммунологических реакциях панели субтипоспецифичных МКА, взаимодействующих с вирусами гриппа потенциально пандемических субтипов. Для вирусов гриппа

каждого субтипа были выбраны пары МКА, наиболее эффективно взаимодействующие в непрямом ИФА с ОК вирусосодержащего материала и не обладающие неспецифической активностью по отношению к вирусам гриппа гетерологичных субтипов. По данным иммуноблоттинга все отобранные МКА были направлены к тяжелой цепи молекулы гемагглютинирина (НА1) вируса гриппа; они активно специфически взаимодействовали с вирусами-иммуногенами в РТГА и непрямом варианте ИФА, а также обладали вирус-нейтрализующей активностью (табл. 1).

Со всеми выбранными МКА были получены конъюгаты МКА-Пх, аналитическая активность которых была оценена при титровании в непрямом варианте ИФА. В качестве антигена использовали ОК вирусосодержащих, сенсibilизированных в твердой фазе. В результате проведенного анализа в качестве рабочего для всех МКА-Пх было принято разведение 1/1000, что соответствовало содержанию МКА в конъюгатах 4—10 мкг/мл. При таком разведении конъюгаты детектировали гомологичные вирусы вплоть до концентраций 1,5—7 нг/мл при отсутствии неспецифического взаимодействия с гетерологичными вирусами.

При конструировании ИФТС для детекции вирусов гриппа каждого из анализируемых субтипов были подобраны пары МКА/МКА-Пх, наиболее эффективно выявляющие очищенный вирус-иммуноген в «сандвич-варианте» ИФА (см. рисунок). При рабочем разведении детектирующих МКА-Пх, равном 1/1000, оптимальной для захвата антигенов была признана концентрация МКА, составляющая 2 мкг/мл.

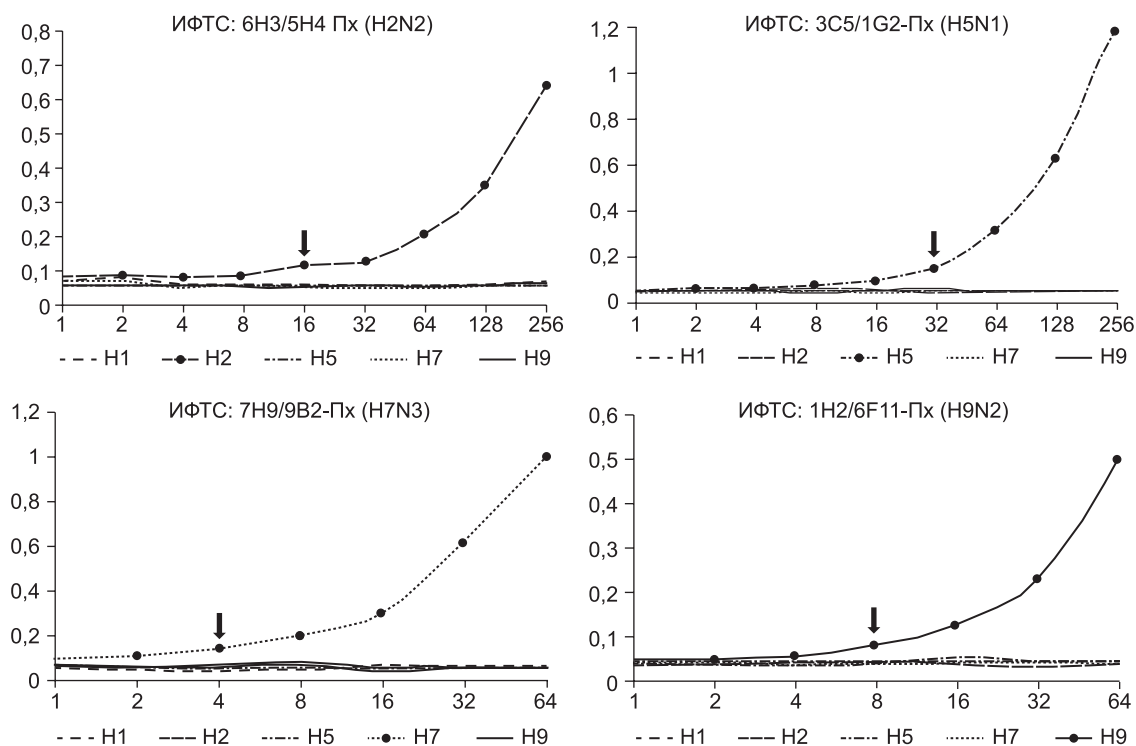
Для оценки чувствительности сконструированных ИФТС были установлены пороговые значения  $OD_{450}$  для проб, положительных по содержанию анализируемого вируса гриппа. С этой целью для каждого из вирусов были определены параметры отрицательных контролей (К отр.) по результатам оценки 10—15 негативных проб, содержащих вирусы, гетерологичные по отношению к вирусу-иммуногену. Средние значения  $OD_{450} \pm$  стандартное отклонение ряда отрицательных проб (К отр.  $\pm$  SD) составили  $0,058 \pm 0,008$ ;  $0,059 \pm 0,007$ ;  $0,06 \pm 0,006$ ;

Таблица 1

**Характеристика моноклональных антител, использованных при конструировании иммуноферментных тест-систем**

Субтипоспецифичность моноклональных антител	Моноклональные антитела	Штамм вируса гриппа, использованный в качестве иммуногена	Антигенная направленность моноклональных антител	Специфическая активность моноклональных антител по отношению к вирусу-иммуногену		
				Антигемагглютинирующая активность (титры в реакции торможения гемагглютинации)	Вируснейтрализующая активность (мкг/мл)*	Активность в непрямом варианте ИФА (нг/мл)**
A(H2)	6H3	A/Singapore/1/57 (H2N2)	HA1	1/2560	1,0	35,1
	5H4	A/Singapore/1/57 (H2N2)	HA1	1/10240	0,2	47,2
A(H5)	3C5	A/Vietnam/1194/04 (H5N1), вакцинный штамм NIBRG-14, клайд 1	HA1	1/192000	0,6	6,3
	1G2	A/Vietnam/1194/04 (H5N1), вакцинный штамм NIBRG-14, клайд 1	HA1	1/96000	1,2	7,6
A(H7)	7H9	A/Mallard/ Netherlands/12/00 (H7N3)	HA1	1/10240	8,9	53,7
	9B2	A/Mallard/ Netherlands/12/00 (H7N3)	HA1	1/640	113,8	5,4
A(H9)	1H2	A/HongKong/1073/99 (H9N2)	HA1	1/640	0,6	3,8
	6F11	A/HongKong/1073/99 (H9N2)	HA1	1/1310720	0,03	1,5

Примечание. \* — нейтрализующую активность МКА определяли по наименьшей их концентрации (мкг/мл), при которой наблюдалось не менее чем двукратное снижение значений  $OD_{450}$  по сравнению с контролем репродукции вируса (по данным реакции нейтрализации с учетом результатов методом микрокультурального ИФА); \*\* — наименьшая концентрации МКА (нг/мл), при которой в непрямом варианте ИФА выявленные значения  $OD_{450}$  не менее чем в 2 раза превышали  $OD_{450}$  отрицательного контроля (лунки с сенсibilизированным антигеном при добавлении пероксидазного конъюгата антител к IgG мыши в отсутствие МКА). В качестве антигена для сенсibilизации планшетов использовали ОК вирусов (2 мкг/мл).



Детекция вирусов гриппа А, обладающих пандемическим потенциалом (по результатам «сэндвич-ИФА»).

По оси абсцисс — концентрация антигена, нг/мл; по оси ординат —  $OD_{450}$ .

Стрелками указан предел чувствительности системы.

Примечание. В модельных экспериментах вирусными антигенами служили очищенные цельновирионные концентраты аллантаисных вирусов, использованные для иммунизации мышей при получении моноклональных антител.

0,062 ± 0,007 для вирусов гриппа А(Н2), А(Н5), А(Н7) и А(Н9) соответственно. Анализ результатов титрования в «сэндвич-ИФА» проб, содержащих гомологичные вирусы ( $n = 10$  для вируса каждого субтипа), показал статистически значимые отличия от негативных проб ( $p < 0,001$ ) в тех случаях, когда за пороговые значения при определении положительных проб были приняты значения, равные (Котр. + 3 SD).

С учетом установленных пороговых значений при выявлении антигенов чувствительность ИФТС варьировала в зависимости от субтипа и штамма вирусов в пределах 4–30 нг/мл при оценке вирусных ОК и 0,3—8 ГАЕ при анализе ВАЖ (табл. 2).

Специфичность ИФТС была продемонстрирована отсутствием неспецифических взаимодействий с гетерологичными вирусами, как сезонными, так и потенциально пандемическими (табл. 3).

**Обсуждение.** Быстрая идентификация потенциально пандемических вирусов гриппа имеет первостепенное значение для предотвращения возможной пандемии, вызванной вновь возникшим и патогенным для человека вариантом вируса. В этой связи особую значимость приобретает разработка современных методов лабораторной дифференциальной диагностики. При диагностике гриппозной инфекции метод ПЦР является наиболее чувствительным. Однако для его применения требуются специальные условия (ПЦР-боксы, дорогостоящее оборудование) и высококвалифицированные кадры. Изоляция респираторных вирусов в культуре клеток — наиболее специфичный диагностический метод, который во многих лабораториях используется в качестве «золотого стандарта», несмотря на чувствительность, уступающую молекулярным методам, и продолжительность анализа (от 3 до

10 дней для вируса гриппа). Кроме того, для успешного его применения требуется наличие инфекционного вируса в клинических материалах.

При обследовании крупных групп населения в целях определения трансмиссии возбудителя в популяции и распознавания атипичных форм гриппозной инфекции ИФА имеет ряд преимуществ перед методами молекулярной диагностики. Белковые антигены вирусов гриппа, детектируемые с помощью этого метода, являются более устойчивыми к внешним воздействиям по сравнению с вирусной РНК, определяемой ПЦР. В дополнение к этому ИФА-диагностика не зависит от инфекционной активности вируса в отличие от метода изоляции вируса в культуре клеток.

Наиболее простым и доступным лабораторным методом идентификации вновь выделенных вирусов гриппа остается РТГА с использованием субтипоспецифичных иммунных сывороток животных. Метод позволяет визуально учитывать результаты взаимодействия антиген-антитело без использования какого-либо оборудования. Вместе с тем он имеет свои ограничения. Особенности структуры рецептор-связывающих сайтов вирусов животного происхождения, к которым относятся потенциально пандемические вирусы гриппа А, могут создавать трудности при их идентификации в РТГА. Так, традиционная постановка метода с использованием эритроцитов кур или индейки оказалась слабочувствительной при детекции вируса гриппа А(Н5N1). Некоторое повышение чувствительности было достигнуто при использовании в качестве индикаторной системы эритроцитов лошади [17], которые, однако, труднодоступны и могут обуславливать неспецифические реакции. Применение субтипоспецифичных

Таблица 2

**Аналитическая чувствительность иммуноферментных тест-систем при детекции вирусов гриппа А пандемических субтипов**

Определяемый субтип вируса гриппа А	Состав тест-системы	Детектируемый вирус	Анализируемый материал	Чувствительность тест-системы*	
				нг/мл	ГАЕ
А(Н2)	6Н3/5Н4-Пх	A/Singapore/1/57 (H2N2)	ОК	15	-
		A/17/California/66/395 (H2N2), вакцинный штамм	ВАЖ	-	1
		A/Singapore/1/57 (H2N2)	ВАЖ	-	1
А(Н5)	3С5/1G2-Пх	A/duck/Potsdam/1402-6/86 (H5N2)	ВАЖ	-	1
		A/turkey/Turkey/05/133 (H5N2)	ВАЖ	-	2
		A/Vietnam/1203/04 (H5N1), клайд 1	ВАЖ	-	2
		A/Vietnam/1194/04 (H5N1), вакцинный штамм NIBRG-14, клайд 1	ОК	30	-
		NIBRG-14 (H5N1)	ВАЖ	-	1
		A/Indonesia/5/05 (H5N1), клайд 2.1	ВАЖ	-	1
		A/chicken/Astana/6/05 (H5N1), клайд 2.2	ВАЖ	-	4
А(Н7)	7Н9/9В2-Пх	A/Mallard/ Netherlands/12/00 (H7N3)	ОК	4	-
		A/Mallard/ Netherlands/12/00 (H7N3)	ВАЖ	-	0,5
		A/Shanghai/2/13 (H7N9)	ОК	4	-
		A/Shanghai/2/13 (H7N9)	ВАЖ	-	1
		A/Anhui/1/13 (H7N9)	ВАЖ	-	8
А(Н9)	1Н2/6F11-Пх	A/HongKong/1073/99 (H9N2)	ОК	7	-
		A/HongKong/1073/99 (H9N2)	ВАЖ	-	0,3

Примечание. \* — последнее разведение анализируемой вирусосодержащей пробы, при котором показатели OD450 превосходили негативный контроль более чем в 1,6 раза. Способ выражения результатов: нг/мл при анализе вирусных очищенных концентратов и количество геммагглютинирующих единиц (ГАЕ) при оценке вирусосодержащей аллантаоисной жидкости.

МКА в ИФА позволяет решить проблему слабого взаимодействия с вирусспецифичными рецепторами на эритроцитах при идентификации не типизируемых в РТГА вирусов. Поскольку в настоящее время наибольшую опасность для людей представляют вирусы А(Н5) и А(Н7), имеющиеся коммерческие ИФТС предназначены для выявления вирусов гриппа именно этих субтипов. Так, при детекции НА вируса гриппа А(Н5) используют наборы для проведения «сэндвич-ИФА» производства «BioAssay Systems» (США), «Animal Genetics, Inc.» (Корея), «Atlas Medical» (Великобритания). Для выявления антигенов вируса гриппа А(Н7N7) предназначены системы «MyBioSource Inc.» (США) и «Sino Biological Inc.» (Китай). На данный момент не существует импортных наборов для ИФА-детекции вирусов гриппа А(Н2) и А(Н9), так же как и отечественных тест-систем для выявления вирусов гриппа животного происхождения с пандемическим потенциалом.

Разработка различных модификаций ИФА для детекции вирусов гриппа А(Н5) и А(Н7) (но не вирусов А(Н2) и А(Н9))

активно ведется во многих зарубежных лабораториях. Так, при конструировании «сэндвич-систем» на стадии захвата используют МКА к НА или NP-белку, на стадии детекции вируса — меченные биотином или пероксидазой хрена МКА к НА [18—21] либо поликлональные субтипоспецифичные сыворотки [18, 22]. При этом показано, что, например, при детекции изолятов вируса гриппа А(J5N1) чувствительность и специфичность субтипоспецифичного «сэндвич-ИФА» составили по сравнению с ПЦР 98 и 100% соответственно. При сравнении с вирусовыделением эти показатели составили 100 и 96% [22].

Порог чувствительности детекции вируса гриппа А, определенный для сконструированных нами ИФТС, в среднем сопоставим с результатами других исследователей. Так, вирус гриппа А(Н5) выявляли в пределах 10—50 нг/мл [18, 19], или 0,5—2 ГАЕ [18, 23]. Чувствительность выявления вируса А(Н7) составляла 1—4 ГАЕ [20, 21].

Таким образом, разработанный нами метод «сэндвич-ИФА» с использованием субтипоспецифичных МКА явля-

Таблица 3

**Специфичность ИФТС при детекции потенциально пандемических вирусов**

Назначение ИФТС (выявление вируса)	OD450 при детекции вирусов в избыточной концентрации (200 нг/мл)						
	Сезонные возбудители эпидемий гриппа			Потенциально пандемические вирусы			
	А(Н1N1) pdm09	А(Н3N2)	В	А(Н2N2)	А(Н5N1)	А(Н7N9)	А(Н9N2)
А(Н2N2)	0,058	0,060	0,057	1,679	0,063	0,060	0,064
А(Н5N1)	0,065	0,054	0,055	0,065	1,477	0,058	0,073
А(Н7N9)	0,057	0,062	0,061	0,063	0,055	0,782	0,056
А(Н9N2)	0,039	0,040	0,038	0,039	0,041	0,039	1,461

ется чувствительным и специфичным тестом для детекции вирусов гриппа А(Н2), А(Н5), А(Н7) и А(Н9), обладающих пандемическим потенциалом. Метод может быть использован для быстрой идентификации вирусов, не типизируемых при рутинной работе практических лабораторий.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—11, 13—15, 17—23  
см. REFERENCES)

12. Соминина А.А., Кривицкая В.З., Войцеховская Е.М., Медведева Н.А., Липина Н.В., Потапенко Л.Б. *Практические рекомендации по диагностике вирусных инфекций*. СПб.; 2005.
16. Соминина А.А., Кривицкая В.З., Третьякова Н.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. *Выявление антител к вирусам гриппа А(H5N1) в сыворотках людей и животных при естественной инфекции и вакцинальном процессе в реакции микронейтрализации. Методические рекомендации*. СПб.; 2009.

Поступила 17.03.16

REFERENCES

1. Richard M., Fouchier R.A. Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(1): 68—85.
2. Jin X.W., Mossad S.B. Avian influenza: an emerging pandemic threat. *Cleve. Clin. J. Med.* 2005; 72(12): 1129—34.
3. Pandemic influenza preparedness and response: a WHO guidance document. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143062/>.
4. Fouchier R.A., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Kemink S.A., Munster V. et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(5): 1356—61.
5. Gao R., Cao B., Hu Y., Feng Z., Wang D., Hu W. et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A(H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(20): 1888—97.
6. WHO Monthly risk assessment summary influenza at the human-animal interface. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/HAI\\_Risk\\_Assessment/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en/).
7. Zhang Q., Shi J., Deng G., Guo J., Zeng X., He X. et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science.* 2013; 341(6144): 410—4.
8. Nabel G.J., Wei C.J., Ledgerwood J.E. Vaccinate for the next H2N2 pandemic now. *Nature.* 2011; 471(7337): 157—8.
9. Ma M.J., Yang X.X., Qian Y.H., Zhao S.Y., Hua S., Wang T.C. et al. Characterization of a novel reassortant influenza A virus (H2N2) from a domestic duck in Eastern China. *Sci. Rep.* 2014; 4: 7588.
10. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(12): 109—20.
11. Matrosovich M.N., Krauss S., Webster R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology.* 2001; 281(2): 156—62.
12. Sominina A.A., Krivitskaya V.Z., Voytsekhovskaya E.M., Medvedeva N.A., Lipina N.V., Potapenko L.B. *Practical Recommendations for the Diagnosis of Viral Infections [Prakticheskie rekomendatsii po diagnostike virusnykh infektsiy]*. St.Petersburg; 2005. (in Russian)
13. Kohler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976; 6(7): 511—9.
14. Laemmli U.R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680—5.
15. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084—91.
16. Sominina A.A., Krivitskaya V.Z., Tret'yakova N.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R. *Detection of Antibodies to Influenza Viruses A (H5N1) in the Sera of People and Animals in Natural Infection and Vaccination Process in Reaction of Microneutralization. Guidelines [Vyjavlenie antitel k virusam grippa A(H5N1) v syvorotkakh lyudey i zhivotnykh pri estestvennoy infektsii i vaksinal'nom protsesse v reaktsii mikroneutralizatsii. Metodicheskie rekomendatsii]*. St.Petersburg; 2009. (in Russian)
17. Stephenson I., Wood J.M., Nicholson K.G., Charlett A., Zambon M.C. Detection of anti-H5 responses in human sera by HI using horse erythrocytes following MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 vaccine. *Virus Res.* 2004; 103(1—2): 91—5.
18. Linke S., Neubauer K., Dorner M.D., Dorner B.G. Pauli G., Schweiger B. Generation and characterisation of monoclonal antibodies against influenza virus A, subtype H5N1. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(1): 85—94.
19. Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa Sh. et al. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2012; 65(1): 19—27.
20. Yang M., Clavijo A., Graham J., Pasick J., Neufeld J., Berhane Y. Evaluation of diagnostic applications of monoclonal antibodies against avian influenza H7 viruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(9): 1398—406.
21. He F., Prabakaran M., Tan Y., Indira K., Kumar S.R., Kwang J. Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against H7 avian influenza virus. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 219.
22. Luo Q., Huang H., Zou W., Dan H., Guo X., Zhang A. et al. An indirect sandwich ELISA for the detection of avian influenza H5 subtype viruses using anti-hemagglutinin protein monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* 2009; 137(1—2): 24—30.
23. Fiebig P., Shehata A.A., Liebert U.G. Generation of monoclonal antibodies reactive against subtype specific conserved B-cell epitopes on haemagglutinin protein of influenza virus H5N1. *Virus Res.* 2015; 199: 46—55.

Received 17.03.16