

Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения IgG антител к вирусу *Varizella zoster* в сыворотке крови человека и оценка ее диагностической эффективности

Л. Н. Лухверчик^{*1}, Г. И. Алаторцева¹, Л. Н. Нестеренко¹, В. Ю. Кабаргина¹, В. В. Доценко¹, И. И. Амиантова¹, О. Б. Выливанная², А. В. Сидоров¹, А. В. Милованова¹, А. С. Оксанич¹, С. Ю. Кананыхина¹, В. В. Зверев¹

¹ФГБНУ НИИВС имени И. И. Мечникова, Москва

²ГБУЗ города Москвы «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента Здравоохранения города Москвы»

Резюме

Актуальность. Внедрение вакцинопрофилактики ветряной оспы диктует необходимость развития методологии контроля эффективности вакцинации и напряженности популяционного иммунитета. Эту проблему можно решить с помощью методов иммуноанализа с количественным учетом результатов. **Цель работы.** Разработка иммуноферментной тест-системы для определения концентрации иммуноглобулинов класса G (AT) к вирусу Варицелла зостер (BB3) и оценка ее технико-аналитических характеристик и диагностической эффективности. **Материалы и методы.** Рекомбинантный антиген GE BB3. Международный стандарт ВОЗ антител к BB3 W1044. Образцы сывороток крови здоровых и больных ветряной оспой и опоясывающим лишаем людей, образцы сывороток крови, содержащие IgG к вирусам простого герпеса первого и второго типов, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна-Барр. Набор реагентов «Anti-VZV ELISA (IgG)» (Euroimmun, Германия). Метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. Иммунизация животных рекомбинантным антигеном GE, выделение и очистка специфических антител. Получение конъюгатов моноклональных антител к IgG человека с антителами к антигену GE и с пероксидазой хрена. **Результаты.** Разработана иммуноферментная тест-система для определения концентрации IgG к BB3 (МЕ/мл) в сыворотке/плазме крови человека в «непрямом» формате. Получен и стандартизован по Международному ВОЗ-стандарту W1044 искусственный калибратор для определения концентрации AT-BB3. Определены основные функциональные характеристики разработанной иммуноферментной тест-системы в соответствии с требованиями ГОСТ 51352-2013. Тест-система испытана на образцах сывороток крови детей больных ветряной оспой (n = 43), взрослых с опоясывающим лишаем (n = 158), здоровых лиц (n = 781). По данным ROC-анализа, диагностическая чувствительность тест-системы составляет 85%, диагностическая специфичность – 87%. Показано отсутствие кросс-реактивности тест-системы на образцах с серологическими маркерами других герпесвирусных инфекций (n = 94). Сравнительные испытания разработанной тест-системы и ее коммерческого аналога – набора реагентов «Anti-VZV ELISA (IgG)» – не выявили статистически достоверных различий между их функциональными характеристиками. **Выводы.** Разработанная тест-система для определения концентрации AT-BB3 в сыворотке/плазме крови человека по функциональным характеристикам соответствует требованиям ГОСТ 51352-2013, характеризуется высокой диагностической эффективностью, может быть использована для контроля вакцинопрофилактики и напряженности популяционного иммунитета, а также для оценки иммунного ответа при ветряной оспе и опоясывающем лишае.

Ключевые слова: ветряная оспа, опоясывающий лишай, количественный иммуноферментный анализ, рекомбинантный антиген GE вируса *Varizella zoster*, антитела к вирусу *Varizella zoster*, герпесвирусные инфекции

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Лухверчик Л. Н., Алаторцева Г. И., Нестеренко Л. Н. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения IgG антител к вирусу *Varizella zoster* в сыворотке крови человека и оценка ее диагностической эффективности. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(6): 72–80. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-72-80>.

Development of the ELISA Test System for Quantitative Determination of IgG to the *Varizella zoster* virus in Human Serum and Assessment of its Diagnostic Efficiency

LN Lukhverchik^{**1}, GI Alatorseva¹, LN Nesterenko¹, VY Kabargina¹, VV Dotsenko¹, II Amiantova¹, OB Vylivannaya², AV Sidorov¹, AV Milovanova¹, AS Oksanich¹, SYu Konanykhina¹, VV Zverev¹

¹I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

²Diagnostic Center (Center for Laboratory Research) of the Department of Healthcare of the City of Moscow, Russia

^{*} Для переписки: Лухверчик Людмила Николаевна, к. м. н., ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а. +7 (495) 917-49-00, mech.inst@mail.ru. ©Лухверчик Л. Н. и др.

^{**} For correspondence: Lukhverchik Liudmila N., Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5a, Maly Kazenny pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 917-49-00, mech.inst@mail.ru. ©Lukhverchik LN, et al.

Abstract

Relevance. The introduction of Varicella vaccine prophylaxis explains the need to develop a methodology for monitoring the vaccination effectiveness and the intensity of population immunity. This problem can be solved using quantitative immunoassay methods. **Aim.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the concentration of class G immunoglobulins (AB) to Varicella zoster virus (VZV) determining and assessing its functional characteristics and diagnostic efficiency. **Materials and methods.** Recombinant antigen GE VZV. WHO International Standard for Antibodies to VZV W1044. Blood serum samples from healthy people and patients with Chickenpox and Herpes zoster, blood serum samples containing IgG antibodies to herpes simplex viruses of the first and second types, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus. Anti-VZV ELISA (IgG) reagent kit (Euroimmun, Germany). Indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Immunization of animals with recombinant antigen GE, isolation, and purification of specific antibodies. Conjugation of monoclonal antibodies to human IgG with antibodies to antigen GE and with horseradish peroxidase. **Results.** An enzyme-linked immunosorbent assay in «an indirect» format has been developed to determine the specific antibodies to VZV concentration (IU/ml) in human serum/plasma. An artificial calibrator for determining the concentration of AB-VZV had been synthesized and standardized according to the International WHO-standard W1044. The main functional characteristics of the developed enzyme-linked immunosorbent assay are determined in accordance with GOST 51352-2013. The diagnostic kit was tested on blood serum samples from children with chickenpox ($n = 43$), adults with Herpes zoster ($n = 158$), healthy individuals ($n = 781$). The diagnostic sensitivity of the test system was 85%, the diagnostic specificity was 87% according to the ROC analysis. The absence of cross-reactivity of the test system was shown on samples with serological markers of other herpesvirus infections ($n = 94$). Comparative trials of the developed test system and its commercial analog, the Anti-VZV ELISA (IgG) reagent kit, did not reveal statistically significant differences between their functional characteristics. **Conclusions.** The developed test system for determining of the AB-VZV concentration in human serum/plasma in terms of its functional characteristics meets the GOST requirements, is characterized by high diagnostic efficiency, can be used to monitor the effectiveness of vaccine prophylaxis and strength of population immunity, as well as to assess the immune response in chickenpox and Herpes zoster.

Keywords: Varicella, Herpes zoster, quantitative ELISA, Varicella zoster virus recombinant antigen GE, Varicella zoster antibodies, herpes viral infections

No conflict of interest to declare.

For citation: Lukhverchyk LN, Alatorseva GI, Nesterenko LN, et al. Development of the ELISA test system for quantitative determination of IgG to the Varicella zoster virus in human serum and assessment of its diagnostic efficiency. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(6): 72–80 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-72-80>.

Введение

Ветряная оспа (ВО) – чрезвычайно контагиозное острое, системное инфекционное заболевание. С возбудителем ветряной оспы – вирусом герпеса человека 3 типа, или вирусом Варицелла зостер (ВЗ) – связано развитие двух форм заболевания: ветряной оспы (ВО) при первом контакте с вирусом и опоясывающего лишая (ОЛ), или Герпеса зостер, при реактивации инфекции [1].

В России ВО на протяжении ряда лет сохраняет одно из ведущих мест среди инфекционных болезней по величине экономического ущерба. Так, в 2019 г. заболеваемость ВО составила 559,1 на 100 тыс. населения, ВО регистрировалась на всей территории РФ в основном среди детского населения. В целом наблюдается тенденция снижения заболеваемости среди детей 3–6 лет, что, вероятно, связано с внедрением вакцинопрофилактики ВО: в 2019 г. вакцинировано около 110 тыс. человек, из них 57% дети. Однако из-за отсутствия отечественной вакцины объемы иммунизации остаются недостаточными и не способны повлиять на эпидпроцесс [2]. В ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова проводятся исследования по созданию отечественной вакцины против ВО [3]. Несмотря на то, что в период пандемии коронавирусной инфекции статистика по ВО среди детей и взрослых показала снижение числа регистрируемых случаев на 45%, заболеваемость остается достаточно высокой: в 2020 г. в РФ было выявлено более 500 тыс. больных [4].

С 2019 г. в России внедрен статистический учет случаев ОЛ. Зарегистрировано более 19 тыс. случаев заболевания, 91% из которых составляют ОЛ у взрослых [2].

С внедрением вакцинопрофилактики ВО возникает потребность в эффективных методах серодиагностики, позволяющих оценивать поствакцинальный иммунитет, дифференцировать случаи инфекции и реинфекции, выявлять бессимптомные формы. Наиболее эффективным подходом является метод иммуноферментного анализа (ИФА) с количественным учетом результатов, позволяющий диагностировать ВО и ОЛ на основе точных критериев.

Имеющиеся к настоящему времени тест-системы для серодиагностики ВО основаны на применении цельновирионного препарата ВВЗ или рекомбинантных аналогов гликопротеина Е ВВЗ (GE) – одного из основных вирусных антигенов группы продуктов поздних генов, избирательно взаимодействующего со специфическими антителами класса G при ВО и ОЛ [5]. В диагностических тестах применяется иммунодоминантный фрагмент белка, не содержащий эпитопов, перекрестно реагирующих с родственными герпесвирусами [6].

Цель исследования – разработка не имеющей отечественных аналогов иммуноферментной тест-системы для определения концентрации иммуноглобулинов класса G (IgG) к ВВЗ в сыворотке крови человека и оценка ее диагностической эффективности. В качестве антигенной основы использован

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

ранее полученный нами рекомбинантный антиген GE, содержащий слитый с β -галактозидазой *E. coli* фрагмент (Gly48 – Glu135) GE [7].

Материалы и методы

Иммунореагенты. Рекомбинантный антиген GE из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова [7]. Набор реагентов для количественного определения антител к BB3 методом ИФА «Anti-VZV ELISA (IgG)» («Euroimmun», Германия, кат. № EI2650-9601 G). Процедуру ИФА и расчет результатов выполняли по инструкции производителя.

Серологический материал. Образцы сыворотки крови из клиничко-консультационного отделения ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и Центра лабораторных исследований Департамента здравоохранения г. Москвы, от детей, больных ВО с клинически подтвержденным диагнозом, (n = 43), взрослых с клинически подтвержденным диагнозом ОЛ (n = 158), здоровых лиц, включая детей и взрослых (n = 781), лиц, инфицированных различными герпесвирусами: вирусом простого герпеса 1 и 2 типа – ВПГ-1/2 (n = 17), вирусом простого герпеса 6 типа – ВПГ-6 (n = 14), вирусом Эпштейна-Барр – ВЭБ (n = 49) и цитомегаловирусом – ЦМВ (n = 14). Образцы сывороток крови, содержащие IgG к ВЭБ, ВПГ-1,2 и ЦМВ, аттестованы по содержанию специфических антител с помощью тест-систем: «BioPlex 2200 EBV IgM» («Bio-Rad», США, кат. № #665-1350), «BioPlex 2200 EBV IgG» («Bio-Rad», США, кат. № #665-1250), «Architect CMV IgM» («Abbott», США, кат. № B6C160), «Architect CMV IgG» («Abbott», США, кат. № B6C150), «Liason HSV-1/2 IgG» («DiaSorin», Италия, кат. № 310800) и «Liason HSV-1/2 IgM» («DiaSorin», Италия, кат. № 310820). Международный стандарт ВОЗ антител к BB3 W1044 (WHO International Standard The First International Standard for Varicella zoster immunoglobulin (1987) NIBSC code: W1044, Англия).

Приготовление конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

Конъюгат пероксидазы хрена («Sigma», Германия) с моноклональными антителами (МАТ) к Fc-фрагменту IgG человека («Сорбент», Россия) готовили методом периодатного окисления [8].

Получение искусственного калибратора для определения концентрации АТ-BB3.

Кроликам-самцам породы «шиншилла» массой 2,5–3,0 кг в подколенные лимфатические узлы задних конечностей и подкожно в область шеи вводили по 0,1 мл эмульсии, состоящей из полного адьюванта Фрейнда («Sigma», Германия) и 0,6 мг/мл рекомбинантного антигена GE в физиологическом растворе в соотношении 1:1. Через 14, 17 и 20 суток подкожно в каждую конечность вводили раствор GE по 0,33 мг; 0,67 мг и 1 мг на 1 кг веса животного соответственно. Забор крови у каждого кролика осуществляли через неделю после последней иммунизации. Гамма-глобулиновую фракцию

сывороток крови иммунизированных кроликов осаждали сульфатом аммония («Sigma», Германия) и дополнительно очищали с помощью аффинной хроматографии на сорбенте «Affi-Prep Protein A Matrix» (Bio-Rad, США). Отбор фракций осуществляли по результатам проверки методами ИФА и электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Конъюгат специфических поликлональных кроличьих антител к антигену GE с IgG человека получали ранее описанным методом [9].

Метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа

Приготовление иммуносорбента. В лунки планшетов для ИФА («Costar», Мексика) вносили по 100 мкл раствора антигена GE BB3 в концентрации 6 мкг/мл в 10 мМ карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 инкубировали в течение 16 ч при температуре +4 °C. По окончании промывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером с 0,1% Твин-20, pH 7,5 – ФСБ-Т (все реактивы производства компании «Sigma», Германия).

Проведение анализа. Сыворотки крови людей, разведенные в 10 раз в ФСБ-Т, содержащем лизат культуры *E. coli*, и образцы калибраторов, приготовленные на основе международного стандарта W1044 или конъюгата специфических поликлональных кроличьих антител к антигену GE с IgG человека, вносили в лунки планшетов с иммуносорбентом и выдерживали 30 мин при температуре 37 °C. Связывание антител с рекомбинантным белком выявляли с помощью конъюгата МАТ с пероксидазой хрена (время инкубации 30 мин). В качестве хромогена использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Оптическую плотность раствора в каждой лунке (ОП) измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan Go (ThermoLabsystems).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel (регрессионная модель системы) и «MedCalc» (по параметрам: описательная статистика, коэффициент корреляции, тест Шапиро-Уилка, ROC-анализ и Т-критерий Уилкоксона для парных образцов).

Результаты и их обсуждение

Разработана иммуноферментная тест-система для определения концентрации (МЕ/мл) специфических антител к вирусу ветряной оспы (АТ-BB3) в сыворотке крови человека методом «непрямого» ИФА. Состав разработанной иммуноферментной тест-системы:

- Иммуносорбент (ИС) – разборный планшет для ИФА с пассивно иммобилизованным рекомбинантным антигеном GE BB3;
- Калибровочные пробы с концентрацией (МЕ/мл) АТ – BB3: 50,0; 5,0; 1,0; 0,2; 0,0, стандартизированные по ВОЗ-стандарту W1044;
- Положительный контрольный образец, инактивированный, приготовленный на основе пула сывороток крови человека с высоким содержанием АТ-BB3;

- Концентрат конъюгата –концентрированный раствор конъюгата МАТ к IgG человека с пероксидазой хрена;
- Раствор для разведения конъюгата;
- Раствор для разведения образцов сыворотки/плазмы крови человека;
- 25-кратный концентрат раствора для промывания планшетов;
- Раствор для разведения хромогена;
- Раствор хромогена.
- Стоп-раствор

Принцип работы тест-системы основан на том, что антитела, находящиеся в калибраторах и анализируемых образцах, во время инкубации взаимодействуют с иммобилизованным в лунках планшета антигеном GE BB3, конъюгат МАТ с пероксидазой хрена выявляет образовавшиеся иммунокомплексы, результаты реакции учитываются спектрофотометрически по окрашиванию субстрата в пероксидазной реакции ТМБ. Для построения калибровочного графика рассчитывали среднее арифметическое значение ОП для параллельных измерений каждого калибратора, затем откладывали на оси ординат значения ОП, а по оси

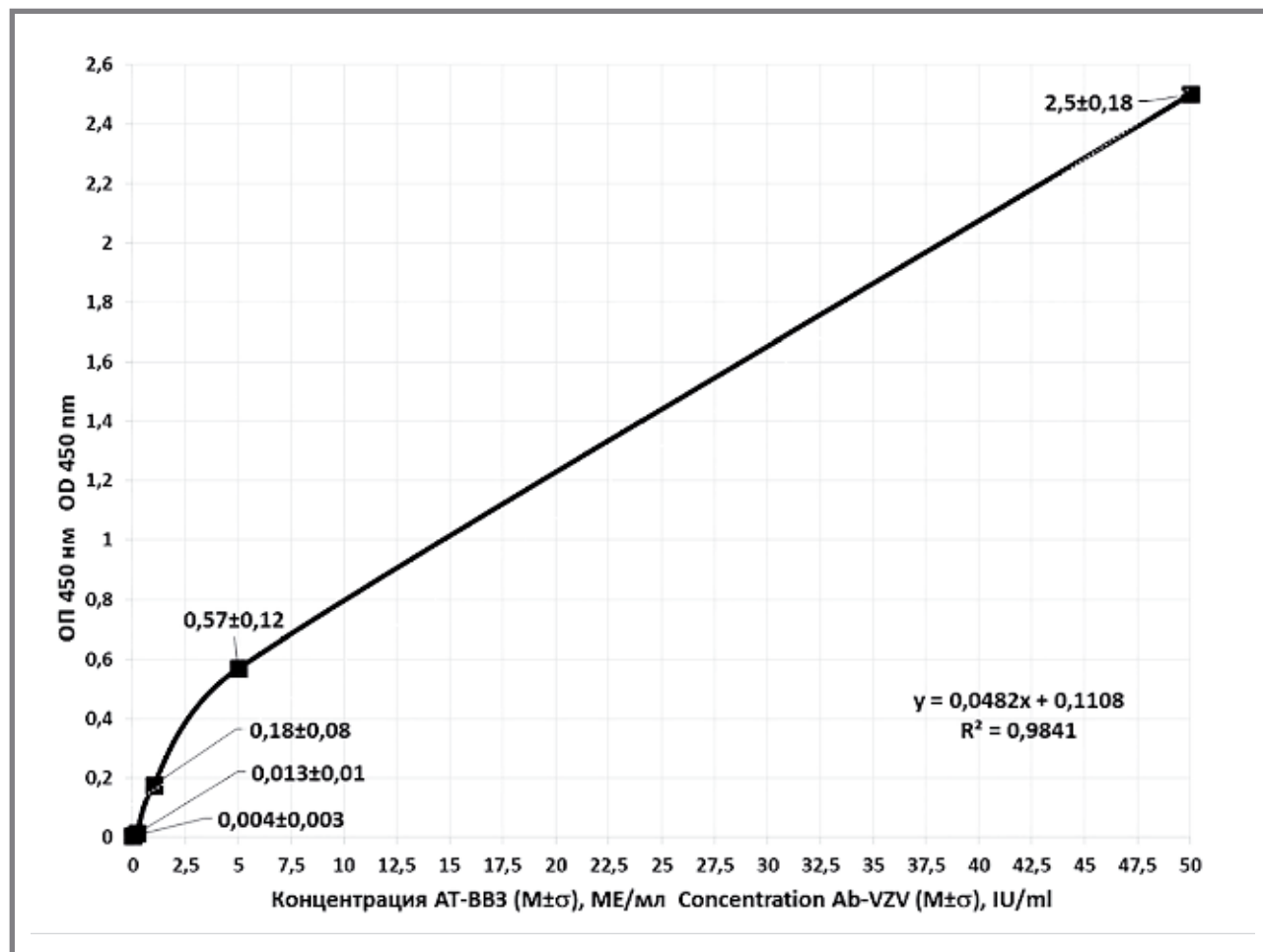
абсцисс – значения концентраций АТ-BB3 (МЕ/мл) для соответствующих калибровочных проб. На основе полученного графика определяли концентрацию АТ-BB3 в анализируемых пробах сыворотки/плазмы крови.

Для приготовления иммуносорбента выбран гликопротеин GE (ORF68) – самый иммуногенный среди гликопротеинов BB3, стимулирующий гуморальный и клеточный иммунитет, обладающий высокой специфичностью и слабой перекрестной реактивностью, что было подтверждено проведенными ранее исследованиями [7,10,11]. При изучении сероконверсии АТ к различным антигенам BB3 [5] было показано, что у инфицированных лиц только к антигену GE BB3 с первых дней заболевания выявляли иммуноглобулины класса А, М и G. Уровень IgG был максимальным на 15-й день заболевания и снижался до минимума к 27 дню.

Выбор искусственного калибратора обусловлен тем, что материал для его создания должен быть однородным, в достаточном количестве, легко стандартизируемым и стабильным в течение длительного времени [12]. Для подготовки

Рисунок 1. График зависимости оптической плотности от концентрации АТ-BB3 в калибровочных пробах для диапазона концентраций 0,0–50,0 МЕ/мл (уравнение регрессии приведено на рисунке)

Figure 1. The dependence curve of the optical density on the Ab-VZV concentration in calibrators for the 0,0–50,0 IU / ml concentration range (the regression equation is shown in the figure)



Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 1. Основные функциональные характеристики разработанной тест-системы

Table 1. Basic functional characteristics of the developed test system

Наименование показателя Indicator name	Величина показателя Indicator value
Аналитическая чувствительность Analytical sensitivity	0,2 МЕ/мл
Тест на «открытие» «Discovery» Test	от 99% до 102% для калибраторов с различными концентрациями from 99% to 102% for different concentrations calibrators
Тест на «линейность» «Linearity» Test	101% в диапазоне от 0 до 50 МЕ/мл in the range from 0 to 50 IU/ml
Коэффициент вариации Variation Coefficient	7,8%
Соотношение: $ОП_0 < ОП_{0,2} < ОП_{1,0} < ОП_{5,0} < ОП_{50,0max}$ Ratio: $OD_0 < OD_{0,2} < OD_{1,0} < OD_{5,0} < OD_{50,0max}$	$0,004 < 0,013 < 0,173 < 0,570 < 2,5$
Соотношение ОП калибровочной пробы с минимальным содержанием АТ-ВВЗ и нулевой калибровочной пробы $ОП_{мин} / ОП_0$ The ratio of the OD of the Calibrator with the minimum content of AB-VZV and the Zero Calibrator OD_{min} / OD_0	3,25
Соотношение ОП калибровочной пробы с максимальным содержанием АТ-ВВЗ и нулевой калибровочной пробы $ОП_{max} / ОП_0$ The ratio of the OD of the Calibrator with the maximum content of AB-VZV and the Zero Calibrator OD_{max} / OD_0	625,0
Интерсепт для калибровочного графика Intercept for the calibration curve	0,110

Рисунок 2. ROC-кривая диагностической эффективности (%) разработанной тест-системы (объяснения в тексте)

Figure 2. ROC-curve of the developed test system diagnostic efficiency (explanations in the text)

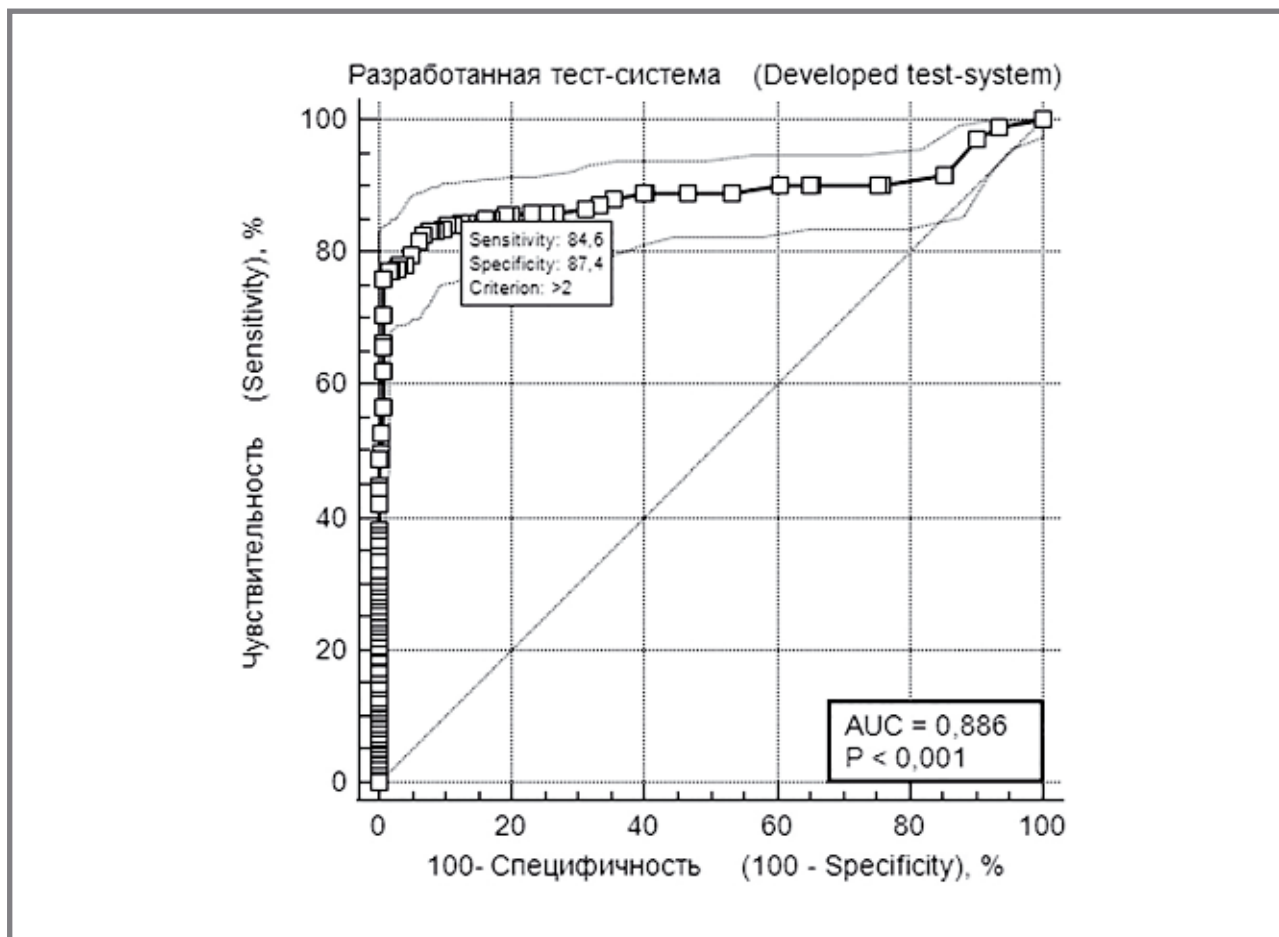


Таблица 2. Результаты определения концентрации АТ-ВВЗ (МЕ/мл) с помощью разработанной тест-системы в исследуемых группах**Table 2. The results of the concentration of Ab-VZV (IU/ml) determining using the developed test system in the study groups**

Обследуемая группа Study group	Число обследованных Number of investigated	Число серопозитивных Number of seropositive	Доля серопозитивных (%) Proportion of seropositive, %	Средняя концентрация АТ-ВВЗ (М ± m) в группе, МЕ/мл Average concentration of AB-VZV (M ± m) in group, IU/ml	ДИ 95% CI 95%
Здоровые лица Health people	781	99	12,7	0,970 ± 0,003	0,911 – 1,028
Дети, больные ВО Children with VZ	43	40	93,0	9,763 ± 1,63*	6,477 – 13,049
Взрослые, больные ОЛ Adults with HZ	158	130	82,3	7,943 ± 0,81**	6,343 – 9,543
Лица, инфицированные различными герпесвирусами, в том числе: Individuals infected with various herpes viruses, including:	94	10	10,6	1,179 ± 0,23	0,733 – 1,624
ВПГ-1/2 HSV -1/2	17	2	11,8	1,332 ± 0,83	0,1 – 4,0
ВПГ-6 HSV-	14	1	7,1	0,679 ± 0,29	0,062 – 1,295
ВЭБ EBV	49	4	8,1	1,216 ± 0,12	0,97 – 1,247
ЦМВ CMV	14	3	21,4	1,081 ± 0,49	0,2 – 1,97

Примечание: * достоверные различия со здоровыми лицами по критерию Уилкоксона-Манна-Уитни; ** достоверные различия со здоровыми лицами по критерию Уилкоксона-Манна-Уитни.

Note: * significant differences with healthy individuals according to the Wilcoxon-Mann-Whitney test; ** significant differences with healthy individuals according to the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

калибровочных проб и их стандартизации полученный искусственный калибратор и ВОЗ-стандарт АТ-ВВЗ титровали в ИФА параллельно путем последовательных двукратных разведений. Анализ полученных результатов показал, что коэффициент корреляции значений ОП калибратора и ВОЗ-стандарта составил $r = 1,0$ (95% ДИ 0,998 – 1,000, $p < 0,0001$). Калибровочные пробы с выбранными концентрациями АТ-ВВЗ (МЕ/мл) использовали в дальнейшем для построения калибровочных графиков. На рисунке 1 представлена форма калибровочного графика, полученная в результате серии экспериментов.

В соответствии с требованиями ГОСТ 51352-2013 [13] и по методикам, приведенным в нем, определены основные функциональные характеристики разработанной иммуноферментной тест-системы для количественного анализа АТ-ВВЗ. Полученные значения оцениваемых характеристик разработанной тест-системы соответствуют регламентируемым значениям (табл. 1).

Для оценки диагностической эффективности разработанной тест-системы использовали метод ROC-анализа, позволяющий проанализировать диагностическую чувствительность и диагностическую

специфичность, а также определить пороговое значение ОП (CutOff) [14,15]. ROC-анализ проводили на основе данных определения концентрации АТ-ВВЗ с помощью разработанной тест-системы в 4 обследованных группах. Результаты представлены на рисунке 2. Для оценки качества тест-системы рассчитывали площадь под ROC-кривой (Area under ROC) – AUC. Чем больше показатель AUC, тем лучше прогностическая способность системы. Для тест-системы этот показатель (рис. 2) составил 0,886 (95% ДИ 0,849–0,924, $p < 0,0001$). По общепринятой классификации наша модель имеет «очень хорошее качество (0,8–0,9)» [16].

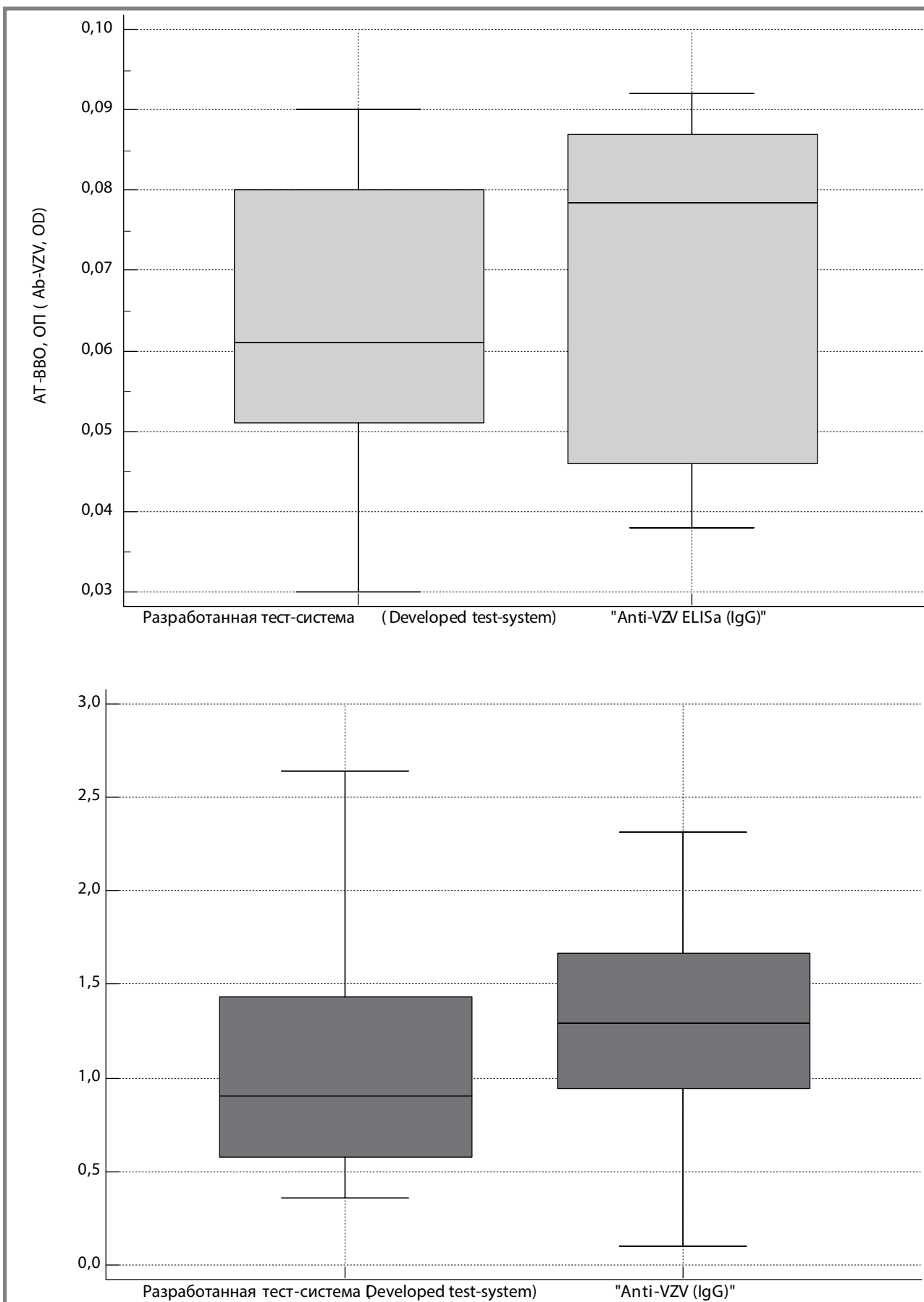
По результатам ROC-анализа диагностическая чувствительность тест-системы составила 84,6% (95% ДИ 78,8–89,3), диагностическая специфичность – 87,4% (95% ДИ 85,0–89,5). CutOff соответствовал 2,0 МЕ/мл: сыворотки с содержанием АТ-ВВЗ менее 2,0 МЕ/мл относятся к отрицательным, а с АТ-ВВЗ более 2,0 МЕ/мл – к положительным. По этим критериям проведена оценка всех исследованных образцов. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Необходимо отметить, предел обнаружения АТ-ВВЗ (аналитическая чувствительность) составил

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Рисунок 3. Результаты оценки отрицательных и положительных образцов в двух тест-системах. Данные представлены в виде медианы (Me), 95% доверительного интервала и интерквартильного размаха [25-й и 75-й перцентили]

Figure 3. The results of evaluating negative and positive samples in two test systems. Data are present as median (Me), 95% confidence interval and interquartile range [25th and 75th percentiles]



0,2 МЕ/мл. Этот показатель соответствует пределу обнаружения в аналогичных европейских тест-системах, участвовавших в исследованиях ESEN2 [17], где он варьировал 0,05 МЕ/мл до 3 МЕ/мл.

Среди исследованных образцов здоровых лиц выявлено 99 (12,7%) положительных, содержание АТ- ВВЗ в них колебалось от 2,2 до 3,5 МЕ/мл. В пробах от детей с ВО концентрация АТ-ВВЗ была достоверно выше в 10 раз, чем у здоровых лиц, в трех исследованных образцах уровень АТ-ВВЗ не превышал 2,0 МЕ/мл, что позволило считать их отрицательными. В образцах от взрослых больных ОЛ уровень АТ-ВВЗ также был достоверно выше в 8,2 раза по сравнению с образцами от здоровых лиц, в 28 образцах из них концентрация АТ-ВВЗ была ниже 2,0 МЕ/мл.

Проведена оценка кросс-реактивности тест-системы на сыворотках с серологическими маркерами других герпесвирусных инфекций. 10 из 94 проб (10,6%) содержали антитела к ВВЗ в концентрации более 2,0 МЕ/мл: в группе с ВПГ-1/2 выявлено 2 положительных образца, среди инфицированных ВПГ-6 – один положительный образец, в группе с ВЭБ – 4 образца, у пациентов с ЦМВ-инфекцией – 3 образца. При этом нельзя исключить реактивацию ОЛ при ЦМВ и ВЭБ на фоне стойкого и длительного снижения иммунной защиты организма [18]. Полученные результаты позволили сделать предположение об отсутствии кросс-реактивности разработанной тест-системы.

Для подтверждения диагностической эффективности разработанной тест-системы проведены сравнительные исследования с использованием ее коммерческого аналога – тест-системы «Anti-VZV ELISA (IgG)» (Euroimmun, Германия). Всего в двух тест-системах протестировано 25 образцов сывороток, из которых двадцать содержали АТ-ВВЗ, пять были серонегативными. При анализе полученных результатов (рис. 3) достоверность различий между двумя тестами определяли с использованием Т-критерия Уилкоксона (для парных образцов). Между результатами, полученными в двух тест-системах, различий не выявлено ($p = 0,657$). Все серонегативные образцы были отрицательными. 20 положительных проб различались

по концентрациям АТ-ВВЗ. Предполагаем, что эти различия могут быть связаны с составом использованных иммуносорбентов. Используемый в разработанной тест-системе иммуносорбент получен на основе рекомбинантного белка GE ВВЗ. В инструкции по применению тест-системы сравнения указано, что источником антигена, использованного при получении иммуносорбента, являлись инаktivированные лизаты инфицированных штаммом «VZ-10» ВВЗ клеток MRC-5, и, таким образом, в результате проведения ИФА должны обнаруживаться антитела ко всему спектру антигенов ВВЗ, в том числе к антигенам, содержащим общие эпитопы с антигенами других герпесвирусов [7]. Тем не менее, сравнительные испытания показали, что диагностическая эффективность тест-системы, разработанной нами на основе только рекомбинантного антигена GE ВВЗ, не имеет статистически достоверных различий с коммерческим аналогом зарубежного производства.

Заключение

В результате проведенных исследований разработана тест-система для определения концентрации АТ-ВВЗ в сыворотке/плазме крови человека методом «непрямого» ИФА. Ее основные функциональные характеристики, определенные в соответствии с ГОСТ 51352-2013, составили: аналитическая чувствительность – 0,2 МЕ/мл, тест на «открытие» – от 99% до 102% для разных калибраторов, тест на «линейность» – 101% в диапазоне от 0 до 50 МЕ/мл, воспроизводимость соответствует коэффициенту вариации равному 7,8%. Диагностическая чувствительность – 85%, диагностическая специфичность – 87%. Показано отсутствие перекрестной реактивности с другими герпесвирусными инфекциями, а также высокая степень сходства по показателям диагностической эффективности с коммерческим аналогом зарубежного производства. Данная тест-система может быть использована в лабораторной практике для контроля эффективности вакцинопрофилактики против ВО и качества разрабатываемых вакцин, изучения популяционного иммунитета, а также для оценки иммунного ответа при ВО и ОЛ.

Литература

1. Учайкин В. Ф., Исаевич Н. И., Шамшева О. В. Инфекционные болезни у детей: учебник. М.: Гэотар-Медиа; 2011.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». Доступно на: https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-019_seb_29_05.pdf. Ссылка активна на 16 июня 2021.
3. Нагичева Ф. Г., Баркова Е. П., Строева А. Д. и др. Характеристика маркеров холодовой адаптации кандидатных вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин против ветряной оспы и опоясывающего герпеса // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т.97, №4. С.303–311.
4. За 2020 год было выявлено более полумиллиона новых случаев ветряной оспы. Доступно на: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/announcement/view/506#>. Ссылка активна на 16 июня 2021.
5. Vizoso Pinto M.G., Pfeiffer K.-I., Janke T., et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella zoster Virus (VZV) antigens // Virol J. 2010. N.7. P.165–173.
6. Park R., Hwang J.Y., Lee K.J., et al. Measurement of antibodies to Varicella zoster virus using a virus-free fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) test // Microbiol Biotechnol. 2015. Vol. 25, N.2. P.268–273.
7. Алаторцева Г. И., Сидоров А. В., Нестеренко Л. Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина е вируса Varicella zoster: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т.15, №1. С.77–85.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J Histochem Cytochem. 1974. Vol. 22, N.12. P.1084–1091.
9. Staros J.V., Wright R.W., Swingle D.M. Enhancement by N - hydroxysulfosuccinimide of water - soluble carbodiimide - mediated coupling reactions // Anal Biochem. 1986. Vol. 156, N.1. P.220–222.
10. Baiker A., Haase R., Eberle J., et al. Early detection of Varicella zoster virus (VZV)-specific T-cells before seroconversion in primary Varicella infection: case report // Virol J. 2010. Vol. 7, N.1. P.54–56.
11. Hasan U.A., Harper D.R., Wren B.W., et al. Immunization with a DNA vaccine expressing a truncated form of Varicella zoster virus glycoprotein E // Vaccine. 2002. Vol. 31, N.20. P.1308–1315.
12. Канев А. Н., Воробьева М. С., Шалунова Н. В. и др. Разработка стандартных панелей сывороток для контроля качества иммуноферментных тест-систем // Вестник Российской Академии медицинских наук. 1998. №3. С.47–51.
13. ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний». Доступно на: <https://docs.cntd.ru/document/1200108445>. Ссылка активна на 16 июня 2021.

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

14. Юнкеров В. И., Григорьев С. Г., Резванцев М. В. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. 3-е изд., доп. СПб.:ВМедА; 2011.
15. Hosmer D.W., Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2nd ed. Wiley (NY); 2000.
16. Григорьев С. Г., Лобзин Ю. В., Скрипченко Н. В. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач // Журнал инфектологии. 2016. Т.8, №4. С.36–45.
17. de Orya F., Echevarria J. M., Kafatos G., et al. European seroepidemiology network 2: Standardisation of assays for seroepidemiology of Varicella zoster virus // J Clin Virol. 2006. Vol. 36, N. 2. P. 111–118.
18. Соломай Т. В., Семенов Т. А., Каражас Н. В. и др. Особенности изменения показателей иммунного статуса лиц с активными и латентными формами герпесвирусных инфекций // Пермский медицинский журнал. 2021; Т.38, №1. С. 46–63.

References

1. Uchaykin V. F., Nisevich N. I., Shamsheva O. V. Infectious diseases in children: textbook. Moscow: Geotar-Media; 2011 (In Russ).
2. State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019». Available at: https://www.rosotrebndazor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-019_seb_29_05.pdf. Accessed: 16 Jun 2021. (In Russ).
3. Nagieva FG, Barkova EP, Stroevo AD, et al. Characterization of markers of cold-adapted candidate virus strains for live attenuated vaccines against chickenpox and shingles. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2020; 97(4): 303–311. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-2>
4. More than half a million new cases of chickenpox were identified in 2020. Available at: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/announcement/view/506#>. Accessed: 16 Jun 2021. (In Russ).
5. Vizoso Pinto MG, Pfrepper K-I, Janke T, et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella zoster virus (VZV) antigens. Virol J. 2010;7:165–73. doi:10.1186/1743-422X-7-165.
6. Park R, Hwang JY, Lee KI, et al. Measurement of antibodies to Varicella-zoster virus using a virus-free fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) test. Microbiol Biotechnol. 2015;25(2):268–73. doi: 10.4014/jmb.1408.08048.
7. Alatorseva GI, Sidorov AV, Nesterenko LN, et al. Recombinant Analogue of Varicella zoster virus Glycoprotein E: Cloning, Expression and Studying of Antigen Properties. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2016; 5(1):77–85 (In Russ).
8. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J Histochem Cytochem. 1974;22(12):1084–91. doi: 10.1177/22.12.1084.
9. Staros JV, Wright RW, Swingle DM. Enhancement by N – hydroxysulfosuccinimide of water – soluble carbodiimide – mediated coupling reactions. Anal Biochem. 1986;156(1):220–2. doi: 10.1016/0003-2697(86)90176-4.
10. Baiker A, Haase R, Eberle J, et al. Early detection of Varicella zoster virus (VZV)-specific T-cells before seroconversion in primary Varicella infection: case report. Virol J. 2010;7(1):54–6. doi: 10.1186/1743-422X-7-54.
11. Hasan UA, Harper DR, Wren BW, et al. Immunization with a DNA vaccine expressing a truncated form of Varicella zoster virus glycoprotein E. Vaccine. 2002;31(20):1308–15. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00475-3.
12. Kanev AN, Vorob'eva MS, Shalunova NV, et al. Development of sera reference panels for quality control of ELISA diagnostic kits in Russia. Vestn Ross Akad Med Nauk. 1998;(3):47–51. (In Russ).
13. GOST R 51352-2013 «Medical devices for in vitro diagnostics. test methods». Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200108445>. Accessed: 16 Jun 2021 (In Russ).
14. Junkerov VI, Grigoriev SG, Rezvantsev MV. Mathematical and statistical processing of medical research data. 3rd ed., add. St. Petersburg:VMedA; 2011 (In Russ).
15. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2nd ed. Wiley (NY); 2000.
16. Grigoriev SG, Lobzin YuV, Skripchenko NV. The role and place of logistic regression and roc analysis in solving medical diagnostic task. Journal Infectology. 2016;8(4):36–45 (In Russ). doi: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45>.
17. de Orya F, Echevarria JM, Kafatos G, et al. European seroepidemiology network 2: Standardisation of assays for seroepidemiology of Varicella zoster virus. J Clin Virol. 2006;36(2):111–8. doi: 10.1016/j.jcv.2006.01.017.
18. Solomay TV, Semenenko TA, Karazhas NV. Features of change of immune status indicators in individuals with active and latent forms of herpes virus infections. Perm Medical Journal. 2021;38(1):46–63. (In Russ). doi: 10.17816/pmj38146663.

Об авторах

- **Людмила Николаевна Лухверчик** – к. м. н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а. +7 (495) 917-49-00, mech.inst@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0002-2997-8892>.
- **Галина Ивановна Алатортсева** – заведующая лабораторией ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (916) 230-78-70, alatorseva@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0001-9887-4061>.
- **Любовь Николаевна Нестеренко** – ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», +7 (916) 377-86-72, lnesterenko3001@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-3825-3906>.
- **Вера Юрьевна Кабаргина** – научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (916) 847-17-79, v.cabargina@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-8784-4497>.
- **Вера Васильевна Доценко** – старший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (903) 551-46-33, verramal@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-5866-944X>.
- **Ирина Ильинична Амиантова** – научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (926) 203-20-12, amianti@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-3483-0128>.
- **Ольга Борисовна Выливанная** – врач ГБУЗ города Москвы «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы», +7 (967) 131-39-93, olliolla11@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-4197-5915>.
- **Александр Викторович Сидоров** – заведующий лабораторией ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (916) 621-05-14, sashasidorov@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-1257-8718>.
- **Александра Владимировна Милованова** – научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (929) 510-15-86, rose_48@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7568-023X>.
- **Алексей Сергеевич Оксанич** – старший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (916) 783-71-89, oksanich@yahoo.com. <http://orcid.org/0000-0002-8600-7347>.
- **Светлана Юрьевна Кананыхина** – заведующая консультативно-диагностическим центром ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (926) 221-47-39, sdieta@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7071-8067>.
- **Виталий Васильевич Зверев** – научный руководитель института ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», +7 (985) 776-05-79, vitalyzverev@outlook.com. <http://orcid.org/0000-0002-0017-1892>.

Поступила: 17.09.2021. Принята к печати: 23.11.2021.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Liudmila N. Lkhverchyk** – Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5a, Maly Kazenny pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 917-49-00, mech.inst@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0002-2997-8892>.
- **Galina I. Alatorseva** – head of the laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (916) 230-78-70, alatorseva@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0001-9887-4061>.
- **Lyubov N. Nesterenko** – senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (916) 377-86-72, lnesterenko3001@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-3825-3906>.
- **Vera Yu. Kabargina** – research associate, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (916) 847-17-79, v.cabargina@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-8784-4497>.
- **Vera V. Dotsenko** – senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (903) 551-46-33, verramal@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-5866-944X>.
- **Irina I. Amiantova** – research associate, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (926) 203-20-12, amianti@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-3483-0128>.
- **Olga B. Vylivannaya** – medical adviser, State Budgetary Institution of Healthcare of the City of Moscow «Diagnostic Center (Center for Laboratory Research) of the Department of Healthcare of the City of Moscow», +7 (967) 131-39-93, olliolla11@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-4197-5915>.
- **Aleksandr V. Sidorov** – head of the laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (916) 621-05-14, sashasidorov@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0003-1257-8718>.
- **Aleksandra V. Milovanova** – research associate, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (929) 510-15-86, rose_48@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7568-023X>.
- **Aleksey S. Oksanich** – senior researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (916) 783-71-89, oksanich@yahoo.com. <http://orcid.org/0000-0002-8600-7347>.
- **Svetlana Yu. Konanykhina** – Head of the consultative and diagnostic center, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (926) 221-47-39, sdieta@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7071-8067>.
- **Vitaly V. Zverev** – scientific director of the institute, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (985) 776-05-79, vitalyzverev@outlook.com. <http://orcid.org/0000-0002-0017-1892>.

Received: 17.09.2021. Accepted: 23.11.2021.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.