



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и производства

Инфекционные
болезни



Вирусы гриппа типа А и В



Грипп (или ОРВИ) — это респираторное заболевание, вызываемое вирусами гриппа. Ежегодно вирусы гриппа типа А и В вызывают сезонные эпидемии. Более того, грипп типа А является причиной периодически возникающих пандемий, в 2009 году, например, возбудителем послужил штамм H1N1.

Заболевание может протекать как в легкой, так и в тяжелой форме. Согласно данным ВОЗ, ежегодно во время эпидемии фиксируются несколько миллионов случаев заболеваний в тяжелой форме и от 250 000 до 500 000 случаев оказываются летальными. Как правило, тяжело болеют люди из группы повышенного риска - маленькие дети, беременные женщины, люди старше 65 лет, а также больные некоторыми заболеваниями.

Существует целый ряд диагностических тестов на вирус гриппа, основанных на различных технологиях - от методов выделения вируса до иммуно- и молекулярно-диагностических методов. Иммунодиагностические тесты, с использованием моноклональных антител (МоАт), часто выгодно отличаются от других из-за простоты выполнения и низкой стоимости, несмотря на то, что чувствительность таких тестов может значительно отличаться.

Биохимия вирусов гриппа типов А и В

Вирусы гриппа типа А и В представляют собой одноцепочечные РНК содержащие (оц-РНК) вирусы с негативной цепью, которые принадлежат к семейству Orthomyxoviridae. Эти вирусы обычно имеют сферическую форму с диаметром 30-100 нм и покрыты оболочкой. Оц-РНК находится в составе рибонуклеиновых комплексов, которые связаны с РНК-зависимой полимеразой и

нуклеопротеином (NP). NP является структурным белком, который определяет принадлежность вируса к разным типам (А, В или С). Два других важных антигена - гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) - находятся на поверхности вируса и являются гликопротеинами.

Вирусы гриппа А делятся на подтипы в зависимости от вариаций белков НА и НА. Известно 18 типов гемагглютинина и 11 типов нейраминидазы. В настоящее время штаммы H1N1 и H3N2 циркулируют как сезонные вирусы гриппа А.

Вирусы гриппа В не подразделяются на подтипы. Как правило, свое название они получают в честь географических регионов, где они были обнаружены впервые.

Реагенты для разработки иммуноферментных анализов для выявления вирусов гриппа

Мы предлагаем широкий выбор МоАт с различной специфичностью, которые позволяют выявлять вирус гриппа А и вирус гриппа В в клинических образцах. Кроме того, мы предоставляем несколько штаммов инактивированных вирусов в качестве антигенов.

Моноклональные антитела к вирусу гриппа А

Наша компания предлагает высокочувствительные и специфические МоАт для обнаружения вируса гриппа А. Они подходят для иммуноферментных анализов (ИФА), таких как прямой или непрямой ELISA, «сэндвич» ИФА и вестерн-блоттинг. Антитела специфичны либо к разным белкам гемагглютинина, либо к нуклеопротеину гриппа А и могут быть использованы для обнаружения этих антигенов в различных биологических образцах, таких как назальные аспираты и мазки, клеточные лизаты и т.д. Поскольку МоАт не обладают перекрестной реактивностью к вирусу гриппа В, они могут быть использованы для точного определения типа вируса – А или В.

Антитела специфичные к NP вируса гриппа А (Кат. № 3IN5)

Мы предлагаем пять различных МоАт, высокоспецифичных к нуклеопротеину вируса гриппа А и не обладающих перекрестной реактивностью с нуклеопротеином вируса гриппа В. Антитела были получены против штамма H1N1. Все МоАт выявляют NP с высокой специфичностью и не обладают перекрестной реактивностью с нуклеопротеином вируса гриппа В. МоАт к нуклеопротеину (анти-NP МоАт) имеют одинаковую чувствительность к разным штаммам вируса гриппа А в ELISA. В качестве примера на Рис.1 приведена кривая титрования InA108 МоАт.

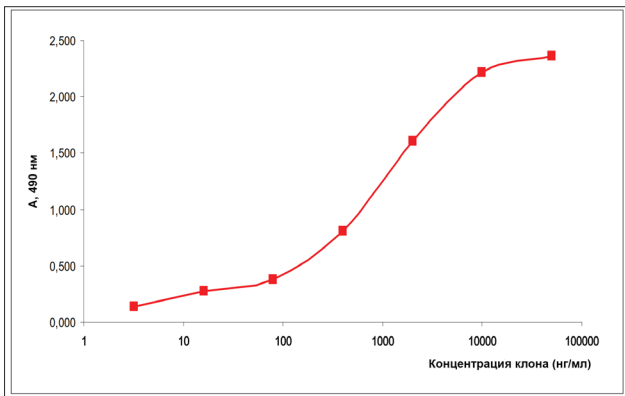


Рис. 1. Кривая титрования МоАт InA108, специфичных к NP вируса гриппа А, выполненная методом непрямого ELISA. Антиген: вирус гриппа A/New Caledonia/20/99 (H1N1); 0,2 мкг/пункта.

Количественный NP «сэндвич» иммуоферментный анализ. Мы протестировали все МоАт в качестве захватывающих и детектирующих антител в «сэндвич» ИФА. Все пары детектируют нуклеопротеин разных штаммов вируса гриппа А. Рекомендованные пары InA108 – InA245 и InA180 – InA245 одинаково детектируют нуклеопротеин в штаммах H1N1 и H3N2. Калибровочная кривая для InA108 – InA245 представлена на Рис. 2.

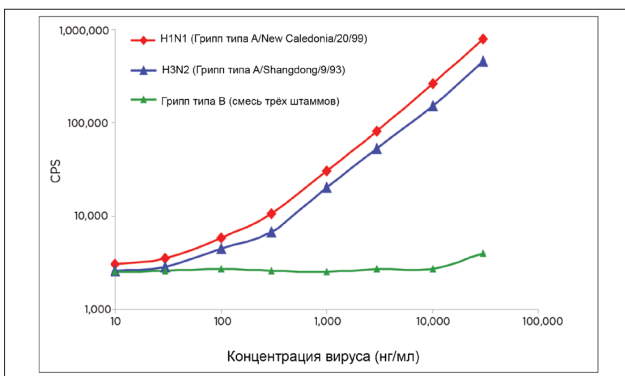


Рис. 2. Калибровочная кривая нуклеопротеина вируса гриппа А (Кат. № 3IN5) с использованием пары клонов МоАТ InA108-InA245, полученная при помощи иммунофлуоресцентного анализа. Антитела распознают различные штаммы вируса гриппа А, но не обнаруживает штаммы вируса гриппа В.

MoAm F8. На основании наших исследований F8 МоАт распознают эпитоп нуклеопротеинов вируса гриппа А с различной антигенной структурой и видовым происхождением. Мы исследовали 25 штаммов вирусов гриппа А человека и птиц, которые были обнаружены в период с 1934 по 1993 год во время различных эпидемий, и во всех случаях наблюдалась специфическая реакция. В дополнении мы исследовали 265 образцов смыва из полости носа у детей, взятых во время вспышек гриппа методом прямого иммунофлуоресцентного анализа. Чувствительность и специфичность выявления вируса гриппа А составили 60% и 98,2% соответственно. Кривая титрования F8 МоАт показана на Рис. 3.

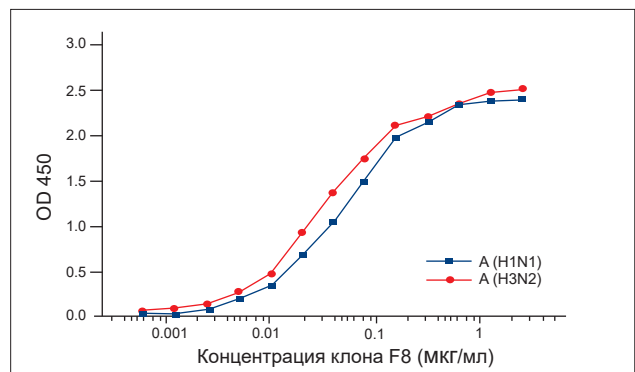


Рис. 3. Кривая специфической активности МоАТ F8, полученная методом ELISA с очищенными вирусными антигенами А H1N1 и H3N2.

Иммунодетекция NP методом вестерн-блоттинга. Для обнаружения NP вестерн-блоттингом после проведения электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил-сульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях могут быть использованы InA108 и InA245 МоАт. Детекция двух различных штаммов вируса гриппа А с помощью InA108 МоАт показана на Рис. 4.

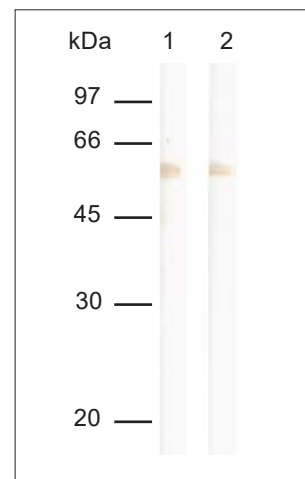


Рис. 4. Иммунодетекция вирусов гриппа А с использованием анти-NP InA108 МоАт методом Вестерн-блоттинга после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Антигены 1 мкг/пункта, МоАт InA108 5 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные IgG антитела, конъюгированные с HRP. Дорожка 1 – Вирус гриппа A/New Caledonia/20/99 (H1N1). Дорожка 2 – Вирус гриппа A/Shangdon/9/93 (H3N2).

Антитела, специфичные к Н1 вирусу гриппа А (Кат. № 3АН1)

Мы предлагаем пять различных МоАт, специфичных к гемагглютинуину Н1 вируса гриппа А. Четыре антитела (Кат.№ 3АН1) были получены против очищенного вируса гриппа А/New Caledonia/20/99 (Н1Н1). МоАт к гемагглютинуину Н1 способны детектировать штамм Н1Н1 в методах прямой и непрямой ELISA, но не способны распознавать штамм Н3Н2.

Количественный Н1 «сэндвич» иммуноферментный анализ. Мы протестировали все МоАт в качестве захватывающих и детектирующих антител в «сэндвич» ИФА. Пара антител InA97-InA134 детектирует выделенный штамм Н1Н1 с высокой специфичностью и чувствительностью. Эти пара антител детектирует вирус и рекомбинантный Н1 гемагглютинин, и может быть использована в ИФА, специфичных к штаммам Н1 вируса гриппа А. Калибровочная кривая для InA97-InA134 представлена на Рис. 5.

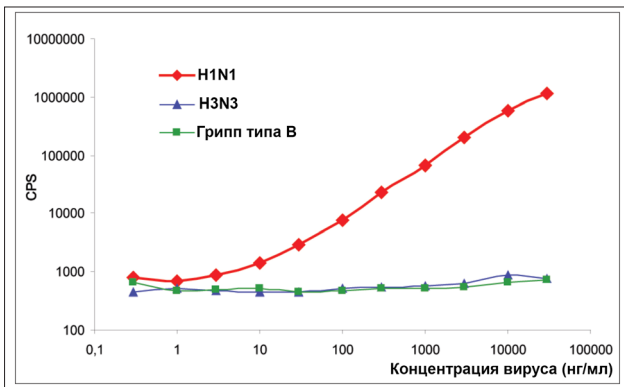


Рис. 5. Калибровочная кривая вируса гриппа А, полученная методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием анти-гемагглютиниана Н1 антител. Захват:
МоАт Захватывающие антитела: InA97 (1 мкг/лунка)
Детектирующие МоАт: InA134, меченные Eu3+ (0,2 мкг/лунка)
Время инкубации: 45 мин
Н1Н1: вируса гриппа А/New Caledonia/20/99
Н3Н2: вируса гриппа А/Shangdong/9/93
Вирус гриппа В: смесь штаммов вируса гриппа В/Qingdao/102/91, В/Токіо/53/99 и В/Victoria/504/00.

Иммунодетекция NP методом вестерн-блоттинга. Анти-Н1 антитела (Кат. №3АН1) был протестированы для использования в вестерн-блоттинге. Все МоАт подходят для детекции штамма Н1 методом вестерн-блоттинг после проведения SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

Антитела, специфичные к Н3 вирусу гриппа А (Кат. № 3НГ3)

Мы предлагаем два МоАт, которые специфичны к гемагглютинуину Н3. Антитела были получены против очищенного штамма вируса гриппа А/Shangdong/9/93 (Н3Н2). МоАт специфичные к Н3 детектируют штамм Н3Н2 методами прямой и непрямой ELISA, но не детектируют штамм Н1Н1. Кривые титрования МоАт InA246 двумя различными штаммами вируса гриппа А представлены на Рис. 6.

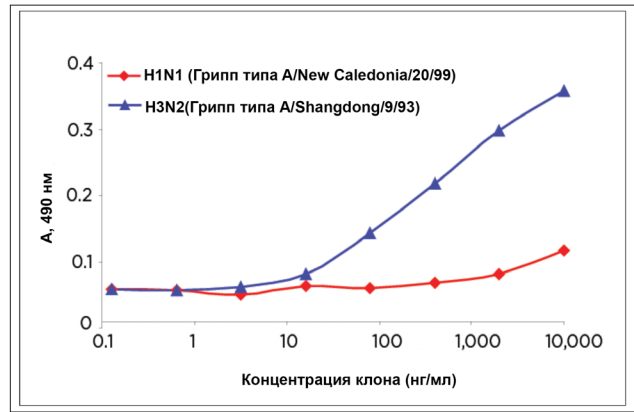


Рис. 6. Кривые титрования МоАт InA246, специфичных к гемагглютинуину Н3.

Иммунодетекция Н3 методом вестерн-блоттинга. Оба МоАт обнаруживают штаммы Н3 вируса гриппа А методом вестерн-блоттинг после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

Антитела, специфичные к Н5 вируса гриппа А (Кат. № 3Н5Н)

Вирусы птичьего гриппа, встречающиеся в природе у птиц, относятся к вирусам гриппа А. Штаммы с подтипами гемагглютиниана Н5 и Н7 могут вызывать высокопатогенный птичий грипп с чрезвычайно высокой заразностью и быстрым смертельным исходом для восприимчивых видов птиц. При вспышках птичьего гриппа с участием вируса гриппа с Н5 гемагглютинином смертность среди домашней птицы обычно составляет от 90% до 100%. Помимо птиц вирусы, содержащие Н5 гемагглютинин, могут вызывать тяжелые инфекции у людей. Мы предлагаем семь различных МоАт, специфичных к Н5 гемагглютинуину. Антитела были получены с использованием очищенного вируса птичьего гриппа А (Н5Н1) в качестве иммуногена.

Антитела, специфичные к Н7 вируса гриппа типа А (Кат. № 3Н17)

Мы предлагаем три МоАт, специфичных к Н7 гемагглютинуину. Антитела были получены против очищенного вируса гриппа А/Netherlands/219/03 Н7Н7. Все МоАт обнаруживают гемагглютинин Н7 вируса гриппа А в методах прямого и непрямого ELISA. Мы исследовали перекрестную реактивность МоАт к другим подтипам гемагглютиниана Н вируса гриппа А: вирус гриппа А Н1Н1 (штамм А/New Caledonia/20/99), вирус гриппа А Н2Н2 (штамм А/Japan/305/57), вирус гриппа А Н3Н2 (штамм А/Panama/2007/99), а также к вирусу парагриппа (тип 1 Sendai). Все МоАт продемонстрировали высокую специфичность к Н7 гемагглютинуину и не связывались с другими протестированными вирусами. Данные по перекрестной реактивности МоАт InA334 представлены на Рис.7 и показывают, что антитела реагируют только на Н7.

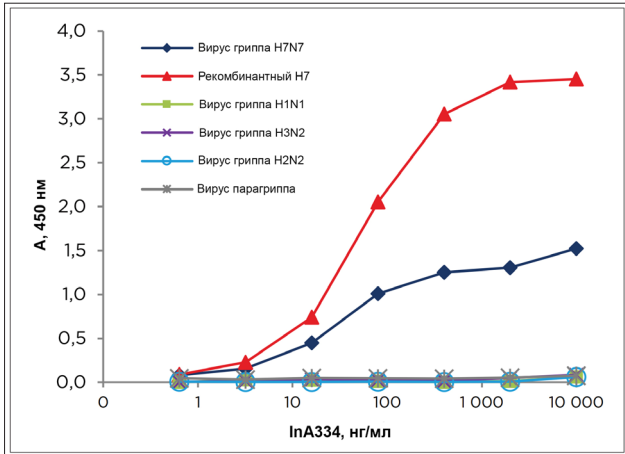


Рис. 7. Кривая титрования МоАт InA344, специфичных к гемагглютиниру H7 вируса гриппа А, выполненная методом непрямого ELISA. Вирусные антигены 200 нг/лунка и рекомбинантный H7 (A/Chicken/Netherlands/1/03; a.a.r. 17-527) 10 нг/лунка.

Количественный H7 сэндвич иммуноферментный анализ. Мы протестировали все МоАт в качестве захватывающих и детектирующих антител в «сэндвич» ИФА. На основании способности выявлять H7 гемагглютинин вируса гриппа А были отобраны лучшие пары МоАт с высокой чувствительностью, очищенный штамм вируса гриппа A/Netherlands/219/03 H7N7 и рекомбинантный H7 были использованы в качестве антигенов. Мы рекомендуем использовать пары InA334 – InA331 и InA334 – InA414. Калибровочные кривые для InA334 – InA331 представлены на Рис.8.

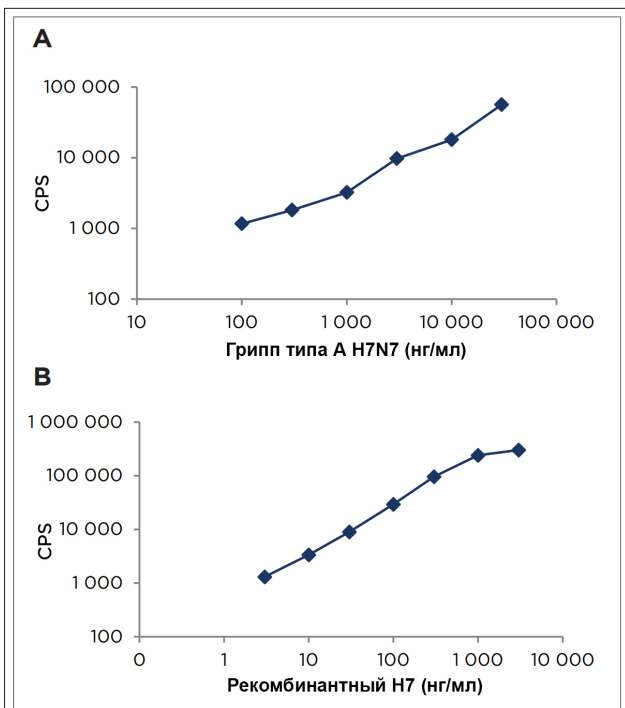


Рис. 8. Калибровочная кривая гемагглютиниру H7 вируса гриппа А, полученная методом «сэндвич» иммунофлуоресцентного анализа. Захват МоАт: InA334 (1 мкг/лунку) МоАт для обнаружения: Eu3+, меченный InA331 (0,1 мкг/лунка) Время инкубации: 45 мин. А) Вирус гриппа A/Netherlands/219/03 (H7N7) В) Рекомбинантный H7 (A/Chicken/Netherlands/1/03; a.a.r.17-527)

Антигены вируса гриппа А

Мы предлагаем девять различных штаммов вируса гриппа А (H1 и H3) в качестве антигенов. Вирусы выделены из аллантаической жидкости 10–12-дневных эмбрионов курицы, инокулированных различными штаммами вируса гриппа А и инактивированных обработкой тимеросалом и бета-пропиолактоном. Чистота всех продуктов составляет >90%. Эти антигены могут быть использованы для обнаружения антител к вирусам гриппа А в ELISA, тестах на ингибирование гемагглютинации и вестерн-блоттинге. Антигены в ELISA не имеют перекрестной реакции как с МоАТ, специфичными к вирусам гриппа А других подтипов HA, так и с МоАТ, специфичными к HA или NP вирусам гриппа В. В тесте на ингибирование гемагглютинации антигены не имеют перекрестной реакции с иммунной сывороткой разных подтипов вируса гриппа А или В (в таблице 1 приведены данные о перекрестной реактивности для двух антигенов).

Таблица 1. Тест на гемагглютинацию антигенов вируса гриппа А. Только H1N1 и H3N2 антигены выявляются иммунной сывороткой, полученной против соответствующих подтипов, и не выявляются другими иммунными сыворотками.

		Антисыворотка кролика к				
		A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/St.Petersburg/186/00 (H3N2)	A/Singapore/1/57 (H2N2)	A/swine/1976/31 (Hsw1N1)	B/Tokio/53/99
Вирус	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	640	<10	<10	<10	<10
	A/Panama/2007/99 (H3N2)	<10	320	<10	<10	<10

Моноклональные антитела к вирусу гриппа В

Наша компания предлагает несколько МоАт, специфичных к NP вируса гриппа В, HA и матричному белку 1 (M1). МоАт работают с высокой аффинностью и специфичностью в различных типах иммуноферментных анализов, включая прямой или непрямой ELISA, системы «сэндвич» иммунодетекции, а также в Вестерн-блоттинге.

Антитела, специфичные к NP вирусу гриппа В (Кат. № 3IF18)

Мы предлагаем несколько МоАт, специфичных к NP вируса гриппа В. Все они производятся *in vitro* и были получены против очищенного вируса гриппа В. Они высоко специфичны к нуклеопротеину вируса гриппа В и не имеют перекрестной реакции с нуклеопротеином вируса гриппа А или другими протестированными вирусными белками. Низкий предел обнаружения наших МоАт позволяет выявить вирус даже в образцах с низким титром вируса гриппа В. Более того, МоАт могут быть использованы в моментальных анализах на вирус гриппа В. В таблице 2 показаны специфические эпитопы. В таблице 3 указаны рекомендации по выбору пар МоАт.

Таблица 2. Эпитопы МоАт, специфичных к нуклеопротеину вируса гриппа В.

Эпитоп	Клон
Фрагмент 1: (1-80 а.к.о.)	InB12, InB36
Фрагмент 2: (120-200 а.к.о.)	InB27, InB64
Фрагмент 3: (240-320 а.к.о.)	InB204, InB210
Фрагмент 4: (480-560 а.к.о.)	InB114, InB213

Таблица 3. Рекомендации по выбору пар антител к нуклеопротеину вируса гриппа В для «сэндвич» иммуноферментного анализа.

Захват	Обнаружение
InB12	InB27
InB12	InB64
InB36	InB64

Все МоАт к NP обнаруживают различные штаммы вируса гриппа В в прямом и непрямом ELISA. Кривые титрования МоАт InB114 показаны на Рис. 9.

Количественный «сэндвич» иммуноферментный анализ вируса гриппа В. МоАт были протестированы в «сэндвич» иммуноферментном анализе в качестве захватывающих и детектирующих антител. Рекомендованные пары (Таблица 3) были отобраны на основе их способности обнаруживать несколько штаммов вируса гриппа В и рекомбинантный NP вируса гриппа В с равной специфичностью и высокой чувствительностью. Были протестированы следующие штаммы: Вирус гриппа В/Leningrad/86/93, Вирус гриппа В/Tokyo/53/99 и вирус гриппа В/Victoria/504/00. Калибровочная кривая для пары InB36 – InB64 показана на Рис. 10.

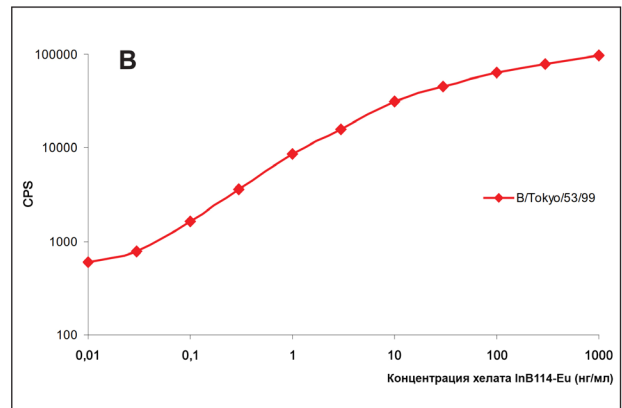
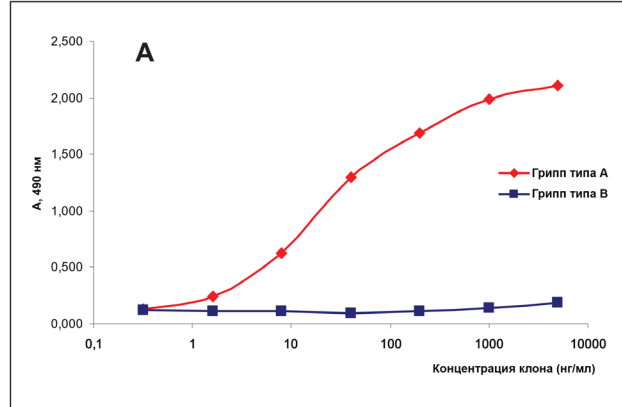


Рис. 9. Кривые титрования МоАт InB114, специфичных к NP вируса гриппа В, полученные методом непрямого (А) и прямого (В) ELISA. Вирус гриппа В: Вирус гриппа В/Tokyo/53/99 (А: 0,5 мкг/лунка, В: 0,2 мкг/лунка). Вирус гриппа А: смесь штаммов вирусов гриппа А/Shangdong/9/93 и А/New Caledonia/20/99 (0,5 мкг/лунку).

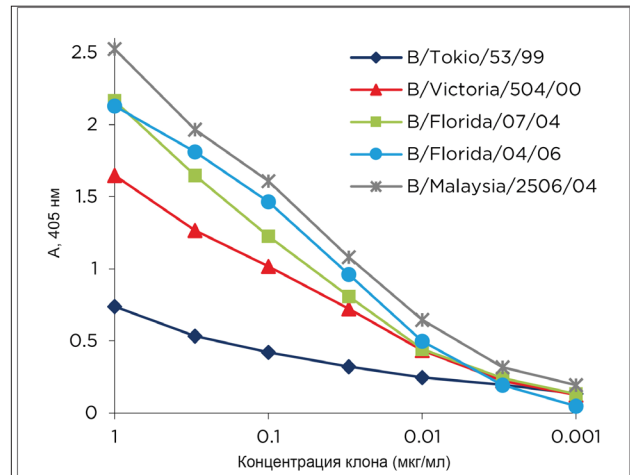


Рис.10. Анализ взаимодействия группы антигенов вируса гриппа В (Кат. № RIF17) с различными штаммами вируса гриппа В, выполненный методом прямой ELISA. Антигены абсорбировали на планшете в концентрации 5 мкг/мл, связывание антител тестировали с использованием серии разведений антител от концентрации 1 мкг/мл до 1 нг/мл.

Иммунодетекция вируса гриппа типа В методом вестерн-блоттинга. МоАт выявляют NP вируса гриппа В при проведении Вестерн-блоттинга после SDS-PAGE в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях. Вестерн-блоттинг с использованием МоАт InB27 и InB63 показан на Рис. 11.

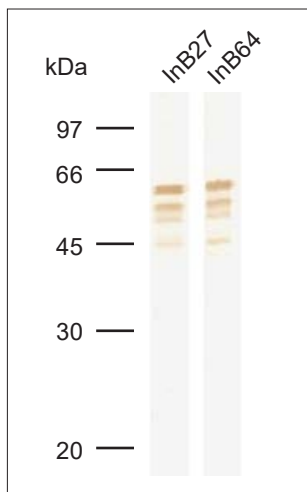


Рис.11. Иммунодетекция NP вируса гриппа В методом Вестерн-блоттинг после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Антиген: вирус гриппа В/Tokio/53/99, 1 мкг/лунка. Антитела InB27 и InB64, 5 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные IgG, конъюгированные с HRP.

Антитела, специфичные к М1 вируса гриппа В (Кат. № 3ВМ17)

Мы предлагаем два МоАт, специфичных к матричному белку М1 вируса гриппа В. МоАт детектируют белок М1 в прямом и непрямом ELISA. Кривая титрования МоАт InB4 показана на Рис.12.

Иммунодетекция М1 методом вестерн-блоттинг. Оба МоАт детектируют М1 при проведении метода Вестерн-блоттинг после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

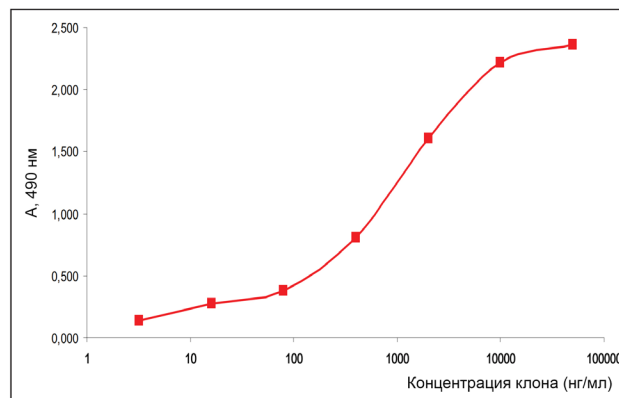


Рис.12. Кривая титрования МоАт InB4, специфичных к М1 вируса гриппа В в непрямом ELISA. Антиген: вирус гриппа В/Tokyo/53/99, 0,5 мкг/лунка.

Информация для заказа

Вирус гриппа А

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Вирус гриппа А (Нуклеопротеин)	3IN5	F8	IgG2a	ИФА, ИГХ
		InA108	IgG1	ИФА, ВБ
		InA180	IgG3	ИФА
		InA224	IgG1	ИФА
		InA245	IgG2b	ИФА, ВБ
Вирус гриппа А (Гемагглютинин Н1)	3АН1	InA97	IgG1	ИФА, ВБ
		InA134	IgG1	ИФА, ВБ
		InA139	IgG1	ИФА, ВБ
Вирус гриппа А (Гемагглютинин Н3)	3HG3	InA227	IgG1	ИФА, ВБ
		InA246	IgG2a	ИФА, ВБ
Вирус гриппа А (Гемагглютинин Н5)	3Н5N	1C7	IgG2a	ИФА, РТГА
		1B4	IgG2a	ИФА
Вирус гриппа А (Гемагглютинин Н7)	3Н17	InA331	IgG1	ИФА
		InA334	IgG1	ИФА
		InA414	IgG2b	ИФА

Вирус гриппа В

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Вирус гриппа В (Гемагглютинин)	3ВН9	InB18	IgG2a	ИФА, ВБ, гемагглютинин 2
		InB190	IgG2b	ИФА, ВБ, гемагглютинин 2
Вирус гриппа В (Белок М1 матрикса)	3ВМ17	InB4	IgG1	ИФА, ВБ
Вирус гриппа В (Нуклеопротеин)	3IF18	InB12	IgG2b	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB27	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB36	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB64	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB114	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB204	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
		InB210	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин
InB213	IgG1	ИФА, ВБ, нуклеопротеин		



ООО «Хайтест»
117105, Россия, г. Москва,
Варшавское шоссе, д. 28А
E-mail: hytest@hytest.ru, sales@hytest.ru
www.hytest.ru