ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:578.833.1]-078.33

И.Н. Трусова¹, А.М. Бутенко¹, В.Ф. Ларичев¹, М.Ю. Щелканов¹, А.Р. Азарян², А.П. Гришанова²,
Е.И. Иващенко², Т.Е. Аршба³, М.В. Говорухина⁴, Н.Ю. Асмолова⁴, И.С. Сиденко⁵, Н.Ф. Василенко⁶,
Н.В. Русакова⁷, Л.В. Шишкина⁷, Б.Ц. Бушкьева⁸

ДИНАМИКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGM- И IGG-АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ

¹ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18;
²ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области», 414057, Астрахань, ул. Кирова, 89;
³ГУЗ «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», 414004, Астрахань, Началовское
ш., 7; ⁴ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», 344019, Ростов-на-Дону, ул. 7-я
Линия, 7; ⁵МБУЗ «Центральная районная больница Сальского района», 347630, Ростовская обл., г. Сальск,
ул. Павлова, 2; ⁶ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, Ставрополь, ул.
Советская, 13-15; ⁷ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», 400049, Волгоград,
ул. Ангарская, 13б; ⁸ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия», 358000, Республика
Калмыкия, г. Элиста, ул. Балакова, 8

Методами ИФА-IgM и ИФА-IgG было обследовано 338 сывороток крови, собранных у 254 больных КГЛ в 2003–2010 гг. в южных эндемичных регионах России. Изучена динамика IgM и IgG специфических антител в течение месяца от начала заболевания, в том числе у пациентов с разными клиническими формами КГЛ, разного возраста, у мужчин и женщин.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, серологическая диагностика, методы ИФА-IgM и ИФА-IgG, динамика специфических антител

I. N. Trusova¹, A. M. Butenko¹, V. F. Larichev¹, M. Yu. Shchelkanov¹, A. R. Azaryan², A. P. Grishanova², E. I. Ivashchenko², T. E. Arshba³,
M. V. Govorukhina⁴, N. Yu. Asmolova⁴, I. S. Sidenko⁵, N. F. Vasilenko⁶, N. V. Rusakova⁷, L. V. Shishkina⁷, B. Ts. Bushkueva⁸

DYNAMICS OF SPECIFIC IGM AND IGG ANTIBODIES IN PATIENTS WITH CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER (CCHF)

¹D. I. Ivanovsky Institute of Virology, 16, Gamalei st, Moscow, Russian Federation, 123098; ²Center of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan region, 89, Kirova Str., Astrakhan, Russian Federation, 414057; ³A. M. Nichogi Regional Clinical Infections Hospital, 7, Nachalovskoe Shosse, Astrakhan, Russian Federation, 414004; ⁴Center of Hygiene and Epidemiology in the Rostov region, 67, 7-ya Liniya Str, Rostov-on-Don, Russian Federation, 344019; ⁵Central District Hospital in Salsk region, 2, Pavlova Str., Rostov region, Russian Federation, 347630; ⁶Stavropol Anti-Plague Institute, 13-15, Sovetskaya, Str., Stavropol, Russian Federation, 355035; ⁷Center of Hygiene and Epidemiology in the Volgograd region, 13b, Angarskaya Str., Volgograd, Russian Federation, 400049; ⁸Center of Hygiene and Epidemiology in Kalmykia, 8, Balakaeva, Elista, Republic of Kalmykia, Russian Federation, 358000

338 blood sera from 254 CCHF patients residing in the south endemical areas of the Russian Federation during 2003–2010 were examined with the use of ELISA-IgM (MAC-ELISA) and ELISA-IgG methods. The dynamics of specific antibodies for a month from the beginning of the disease including patients with different clinical forms of CCHF, cases of different ages, males and females has been investigated.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever, serological diagnosis, ELISA-IgM, ELISA-IgG, dynamics of the specific antibodies

Введение

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – это природно-очаговая острая инфекция человека, протекающая с лихорадочной реакцией, общей интоксикацией и геморрагическим синдромом, выраженным в виде кожных кровоизлияний и разнообразных полостных кровотечений. Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ)¹ передается, главным образом, при укусе иксодовых клещей. Возбудитель относится к роду *Nairovirus* семейства

Bunyaviridae. Ареал этой инфекции охватывает многие эндемичные регионы Африки, Азии и Европы. В России заболеваемость КГЛ зарегистрирована в Астраханской, Ростовской, Волгоградской областях, Ставропольском и Краснодарском краях, Калмыкии, Дагестане, Ингушетии и Карачаево-Черкесии.

Для специфической диагностики КГЛ в эндемичных регионах России и зарубежных стран в настоящее время широко используются методы иммуноферментного анализа: ИФА-IgM и ИФА-IgG,

¹Целесообразность использования двух различных названий: нозологической формы заболевания (КГЛ) и вируса-возбудителя (ККГЛ) сформулирована в предыдущих публикациях [4, 6].

Для корреспонденции: Трусова Ирина Николаевна, мл. науч. сотр. ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», e-mail: irina-trusova@yandex.ru

а также ОТ-ПЦР. Однако сведения по применению ИФА-IgM, ИФА-IgG и ОТ-ПЦР, опубликованные в иностранных изданиях, весьма ограничены и основаны на анализе обследования незначительного числа сывороток больных [15, 19]. При большом объеме подобных исследований, выполняемых в диагностических лабораториях Астрахани, Волгограда, Ростова-на-Дону, Ставрополя и Элисты, полученные результаты в достаточной степени не проанализированы и не отражены в публикациях [1–3, 7, 8, 12]. Не представлены данные по динамике IgM и IgG у больных с различными формами КГЛ, в разных возрастных группах, у мужчин и женщин.

Таким образом, актуальность наших исследований определяется недостаточным качеством и объемом информации, имеющей прямое отношение к интерпретации данных серодиагностического обследования больных КГЛ.

Материалы и методы

Сыворотки крови. Сыворотки крови и сведения о больных КГЛ были получены в 2003–2010 гг. из вирусологических лабораторий ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области», Астрахань, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», Ростов-на-Дону, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», Волгоград; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия», Элиста. В этих лабораториях сыворотки больных (в разведениях от 1:100 до 1:800–1:3200) были обследованы методом ИФА-IgM, а некоторые – ИФА-IgG. Окончательное титрование сывороток (для определения конечного разведения антител в положительных пробах) было выполнено в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва.

В тест-системах ИФА-IgM и ИФА-IgG на антитела к вирусу ККГЛ были обследованы 338 сывороток крови, взятых у 254 больных КГЛ: 100 сывороток от 77 больных из Астраханской области (2003–2010), 7 сывороток от трех больных из Волгоградской области (2003), 170 сывороток от 124 больных из Ростовской области (2004–2010), 23 сыворотки от 22 больных из Ставропольского края (2009), 38 сывороток от 28 больных из Калмыкии (2005).

Метод ИФА-IgM. Определение специфических IgM антител к вирусу ККГЛ проводили методом МАС-ELISA [17]. В лунках полистеролового планшета сорбировали козьи антитела IgG (производство фирмы Sigma, США), против μ -цепи иммуноглобулина человека. Затем последовательно вносили обследуемые сыворотки, сахарозо-ацетоновый антиген вируса ККГЛ (или нормальный контрольный антиген из мозга неинфицированных новорожденных белых мышей) и мышинные моноклональные антитела против вируса ККГЛ (ГЕМА-12), меченные пероксидазой хрена.

На каждом из этапов постановки ИФА-IgM реакционные компоненты инкубировались 1 ч при температуре 37° С, а затем смесь тщательно промывали

0,01 М фосфатно-буферным раствором pH 7,4 с добавлением 0,15 М NaCl и 0,05% твина-20.

Субстрат-индикаторной системой служил раствор тетраметилбензидина с 0,006% перекиси водорода H_2O_2 . Реакцию останавливали 2N-раствором серной кислоты. Результаты реакции учитывали по величине оптической плотности при длине волны 450 нм. В каждом опыте использовали гетерологичные или нормальные контрольные антигены, а также контрольные, позитивные на IgM антитела, сыворотки больных КГЛ. Реакцию считали положительной, если отношение экстинкции опытных и контрольных образцов составляло не менее 3,0 (при ОП₄₅₀ не ниже 0,3 для опытных образцов и не выше 0,1 в контроле).

Метод ИФА-IgG. Определение специфических IgG антител к вирусу ККГЛ проводили методом ИФА-IgG [17] в 96-луночных полистироловых планшетах с сорбированными поликлональными мышинными антителами IgG к вирусу ККГЛ в КББ. Остальные реагенты вносили в следующей последовательности: блокирующий раствор 1% бычьего сывороточного альбумина, специфичный вирусный антиген (или нормальный контрольный антиген), обследуемые сыворотки и мышинные антитела против иммуноглобулинов класса IgG человека, меченные пероксидазой хрена (ГНЦ РФ «Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства», г. Москва). Результаты реакции учитывали так же, как при постановке МАС-ELISA.

Статистические методы. Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным формулам [10, 11, 13]. Среднее геометрическое титров (M_x) и среднее квадратичное отклонение (σ_x) рассчитывали по формулам:

$$M_x = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}; \quad \sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M_x)^2}{n-1}},$$

где, $x_1, x_2, \dots, x_n$ – это n реализаций случайной величины X .

Поскольку титры специфических антител, выявляемых у больных КГЛ методом ИФА не подчиняются нормальному (гауссовому) распределению, для непараметрической оценки достоверности различий двух статистических выборок использовали метод Манна–Уитни. Уровень значимости (p) был принят равным $\leq 0,05$.

Математическая и статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ Microsoft Office Excel 2003 и Microsoft Office Access 2003.

Результаты и обсуждение

Динамика специфических IgM. На IgM к вирусу ККГЛ были обследованы 338 сывороток крови 254 больных с подтвержденным диагнозом КГЛ. Специфические IgM к вирусу ККГЛ были обнаружены в 297 (87,9%) пробах от 249 больных, взятых с 1-го по 30-й день заболевания. В периоды с 1-го по 5-

Таблица 1

Суммарные данные обследования в ИФА-IgM сывороток крови больных КГЛ с 1-го по 30-й день заболевания

Дни от начала заболевания	Число обследованных сывороток	Процент положительных проб	Средние геометрические обратных титров	
			$\log \pm \sigma$	титр
1–5	40	40,0	$13,1 \pm 2,8$	1:8700
6–7	44	81,8	$13,1 \pm 2,4$	1:8600
8–9	65	96,9	$13,5 \pm 2,5$	1:11 400
10–11	70	97,1	$13,8 \pm 2,1$	1:14 600
12–13	35	91,4	$14,4 \pm 1,2$	1:22 000
14–15	33	100,0	$14,5 \pm 2,2$	1:22 700
16–17	19	94,7	$13,1 \pm 3,1$	1:9000
18–20	14	92,9	$14,0 \pm 2,1$	1:16 000
21–30	18	100,0	$14,4 \pm 2,6$	1:21 000
Всего	338	87,9	$13,8 \pm 2,4$	1:13 800

6-, 7-й и начиная с 10-го дня болезни частота выявления IgM-положительных сывороток составляла соответственно 40,0; 81,8 и 97,1–100%. Средние геометрические титров при этом составляли от 1:8700 на 1–5-й день, достигали максимального значения 1:22 700 на 14–15-й день, достоверно превышая титры на 6–7-й и 8–9-й дни ($p < 0,01$ и $p < 0,05$). Высокие показатели IgM сохранялись в течение месяца от начала заболевания (табл. 1).

Для выявления особенностей динамики специфических антител у больных КГЛ с разной клинической формой болезни средние геометрические титров IgM рассчитывали по результатам титрования в ИФА-IgM 245 сывороток от 200 больных КГЛ. Клиническая форма заболевания определялась лечебными учреждениями по месту госпитализации больного.

На долю тяжелых случаев КГЛ с геморрагическим синдромом приходилось 19% больных, тяжелых случаев без геморрагического синдрома – 4,5%, среднетяжелых с геморрагическим синдромом – 25%, среднетяжелых без геморрагического синдрома – 36,5%, легких форм с геморрагическим синдромом – 1,5%, легких форм без геморрагического синдрома – 13,5%.

У больных с легким течением болезни с 1–7-го по 8–11-й день болезни происходило нарастание титров IgM антител от 1:7600 до 1:16 400, на 12–15-й день до 1:23 200, высокий уровень IgM сохранялся в период между 16-м и 30-м днями. У больных со среднетяжелым течением заболевания титры IgM между 1–7-м и 8–11-м днями также возрастали в 2 раза с 1:7100 до 1:14 300, сохраняясь на этом уровне до 16-го дня и позднее. При тяжелом течении заболевания титры IgM антител по сравнению с 1–7-м днями болезни практически не возрастали на 8–11-й день (соответственно 1:5400 и 1:6700), на 12–15-й день заболевания увеличивались в 2 раза (с 1:6700 до 1:13 300), однако после 16-го дня снова снижались. Доля положительных в ИФА-IgM сывороток крови больных с разным клиническим течением заболевания до 16-го дня различается несущественно (табл. 2).

При сравнении титров IgM у больных КГЛ во все анализируемые сроки обследования отмечается постоянная тенденция выявления более высоких титров антител при легком течении заболевания по сравнению со среднетяжелым и тяжелым, а также более высоких титров при среднетяжелой форме по сравнению с тяжелой. У больных с легкой формой КГЛ достоверно более высокие титры специфических IgM, чем при тяжелой форме (соответственно 1:15 300 и 1:7600) ($p < 0,05$). Кроме того, у пациентов со среднетяжелой формой КГЛ титры IgM в первые 7 дней болезни достоверно ($p < 0,02$) ниже, чем на 12–15-й день (соответственно 1:7100 и 1:16 400).

Таким образом, сравнение титров специфических IgM-антител у больных КГЛ в 1-ю неделю заболевания, а также на 12–15 день может иметь значение для прогноза клинического течения заболевания. Двукратное возрастание титров IgM антител на 8–11 день по сравнению с первыми днями, вероятно, может свидетельствовать о возможном благоприятном завершении заболевания в виде легкой или среднетяжелой формы.

При изучении динамики специфических IgM-антител у больных КГЛ разных возрастных групп были обследованы в ИФА-IgM 334 сывороток от 251 больного КГЛ, из них 17 (6,8%) больных были моложе 19 лет, 80 (31,9%) – в возрасте от 20 до 39 лет, 107

Таблица 2

Динамика титров специфических IgM-антител у больных КГЛ в зависимости от клинической формы заболевания и времени обследования

Дни от начала заболевания	Форма течения заболевания											
	тяжелая				среднетяжелая				легкая			
	число проб	процент положительных проб	$\log \pm \sigma$	титр	число проб	процент положительных проб	$\log \pm \sigma$	титр	число проб	процент положительных проб	$\log \pm \sigma$	титр
1–7	22	68,1	$12,4 \pm 2,9$	1:5400	39	48,7	$12,8 \pm 1,7$	1:7100	13	61,5	$12,9 \pm 3,6$	1:7600
8–11	21	95,2	$12,7 \pm 2,5$	1:6700	63	98,4	$13,8 \pm 2,3$	1:14 300	12	91,7	$14,0 \pm 2,1$	1:16 400
12–15	13	92,3	$13,7 \pm 2,0$	1:13 300	27	96,3	$14,0 \pm 2,1$	1:16 400	6	100	$14,5 \pm 2,1$	1:23 200
16–30	5	60,0	$12,8 \pm 4,4$	1:7100	19	100	$14,0 \pm 2,4$	1:16 400	5	100	$14,8 \pm 2,4$	1:28 500
Всего...	61	82,0	$12,9 \pm 2,6$	1:7600	148	84,4	$13,7 \pm 2,2$	1:13 300	36	83,3	$13,9 \pm 2,6$	1:15 300

Таблица 3

Динамика титров специфических IgM-антител у больных КГЛ в разных возрастных группах в зависимости от времени обследования

Дни от начала заболевания	Возрастные группы											
	до 40 лет				40–59 лет				60 лет и старше			
	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр
1–7	30	63,3	13,0 ± 2,0	1:8200	40	60,0	13,6 ± 2,3	1:12 400	15	66,7	12,7 ± 3,0	1:6700
8–11	55	96,4	14,4 ± 2,0	1:21 600	49	98,0	13,4 ± 2,5	1:10 800	27	96,3	13,0 ± 1,9	1:8200
12–15	24	96,0	14,5 ± 2,3	1:23 200	33	93,6	14,4 ± 1,8	1:21 600	9	100	14,3 ± 2,6	1:20 200
16–30	17	92,3	15,0 ± 1,9	1:32 800	23	94,4	14,0 ± 2,9	1:16 400	12	100	11,6 ± 2,9	1:3100
Всего...	126	88,3	13,9 ± 2,6	1:15 300	145	85,7	13,4 ± 2,6	1:10 800	63	90,5	12,6 ± 2,7	1:6200

(42,6%) – в возрасте от 40 до 59 лет и 47 (18,7%) – 60 и более лет. Вследствие малочисленности группы больных КГЛ младше 20 лет при статистическом анализе ее объединили с группой в возрасте от 20 до 39 лет.

Титры специфических IgM у больных КГЛ в возрастной группе 60 лет и старше оказались существенно ниже, чем в других возрастных группах. Максимальные титры IgM отмечены у больных в возрасте до 40 лет на 12–15-й день (1:23 200) и на 16–30-й день заболевания (1:32 800). С увеличением возраста пациента титры специфических IgM снижаются: 1:15 300, 1:10 800 и 1:6200 соответственно для групп до 40 лет, 40–59 лет и старше 60 лет. Доля положительных в ИФА-IgM сывороток крови больных разных возрастов различается несущественно (табл. 3).

По критерию Манна–Уитни наиболее достоверная разница во все сроки заболевания наблюдается при обследовании групп пациентов до 40 лет и 60 лет и старше ($p < 0,009$). Достоверность различий в титрах специфических IgM между разными возрастными группами пациентов имеет место и при рассмотрении отдельных периодов болезни.

Таким образом, метод ИФА-IgM обладает диагностической эффективностью при обследовании больных любых возрастных групп, однако факт выявления более низких титров специфических IgM-антител у пожилых больных может рассматриваться как негативный прогностический признак.

Для изучения динамики специфических IgM-антител у мужчин и женщин было обследовано 338

сывороток крови от 254 больных КГЛ, среди которых было 165 (65,0%) мужчин и 89 (35,0%) женщин. Установлено, что динамика специфических IgM-антител у мужчин и женщин, больных КГЛ, практически не различается. С первых дней заболевания в обеих группах наблюдается постепенное возрастание титров IgM до 16-го дня. Доля положительных находок специфических IgM в разные периоды обследования в течение месяца от начала болезни также совпадает (табл. 4).

Достоверные различия в титрах IgM-антител у мужчин и женщин наблюдались при их обследовании на 1–7-й ($p < 0,001$) и 8–11-й день заболевания ($p < 0,04$). Достоверно различались титры IgM у женщин между 1–7, и 12–15-м днями заболевания ($p < 0,02$), а также между 8–11 и 12–15-м днями ($p < 0,002$). У мужчин достоверные отличия в титрах IgM выявлены между 1–7-м и 12–15-м днями заболевания, а также между 1–7-м и 16–30-м днями. Эти данные совпадают с общей, суммарной динамикой IgM-антител, выявляемых в сыворотках крови всех обследованных больных КГЛ.

Динамика специфических IgG. На IgG к вирусу ККГЛ были обследованы 332 сыворотки крови 254 больных с подтвержденным диагнозом КГЛ. Специфические IgG к вирусу ККГЛ в целом по пяти регионам были обнаружены в 172 (52,1%) пробах, взятых с 1-го по 30-й день заболевания. Специфические IgG в периоды 1–7-го, 12–15-го и 16–18-го дней обнаруживали соответственно в 24,4; 47,7; 68,7 и 83,6–

Таблица 4

Динамика титров специфических IgM-антител у мужчин и женщин, больных КГЛ, в зависимости от времени обследования

Дни от начала заболевания	Пол больных							
	мужчины				женщины			
	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр
1–7	43	44,2	12,6 ± 2,7	1:6200	42	68,3	13,4 ± 2,4	1:10 800
8–11	89	97,8	13,8 ± 2,4	1:14 300	45	95,5	13,3 ± 2,0	1:10 100
12–15	41	92,7	14,1 ± 2,3	1:17 600	27	100	14,8 ± 1,7	1:28 500
16–30	39	97,3	14,1 ± 2,5	1:17 600	12	100	13,4 ± 2,6	1:10 800
Всего...	212	85,7	13,8 ± 2,5	1:14 300	126	87,9	13,7 ± 2,2	1:13 300

Таблица 5

Результаты обследования в ИФА-IgG сывороток крови больных КГЛ с 1-го по 30-й день заболевания

День заболевания	Число обследованных сывороток	Процент положительных проб	Средние геометрические обратных титров	
			log ± σ	титры
1–7-й	82	24,4	8,2 ± 1,8	1:290
8–11-й	132	47,7	8,6 ± 2,1	1:390
12–15-й	69	68,7	9,4 ± 1,9	1:680
16–18-й	23	83,6	10,1 ± 2,7	1:1100
19–30-й	26	92,3	9,9 ± 2,1	1:960
Всего...	332	52,1	9,1 ± 2,2	1:550

92,3% случаев. Средние геометрические титров IgG в сроки на 1–7; 8–11; 12–15 и 16–30-й дни составляли 1:290; 1:680 и 1:1100. Средний показатель титров 1:960 сохраняется до конца месяца, достоверно на более высоком уровне ($p < 0,01$ и $p < 0,005$), чем на 1–7-й и 8–11-й дни (табл. 5).

Для выявления особенностей динамики специфических IgG-антител у больных КГЛ в зависимости от клинической формы болезни в ИФА-IgG было обследовано 270 сывороток крови от 200 больных КГЛ.

Титры специфических IgG у больных с разными клиническими формами не имели существенных различий. При тяжелой, среднетяжелой и легкой формах заболевания наблюдали возрастание титров от $7,9 \pm 1,9 \log_2$ (1:240), $7,4 \pm 0,5 \log_2$ (1:170) и $9,0 \pm 1,5 \log_2$ (1:510) на 1–7-й день до $10,4 \pm 4,1 \log_2$ (1:1400), $10,3 \pm 2,9 \log_2$ (1:1300) и $9,8 \pm 1,1 \log_2$ (1:890) на 16–30-й дни соответственно. Титры антител у больных со среднетяжелой формой заболевания на 12–15-й и 16–30-й дни статистически достоверно выше, чем на 1–7-й день ($p < 0,004$, $p < 0,01$).

Во всех трех группах с тяжелой, среднетяжелой и легкой формами КГЛ наблюдалось возрастание доли положительных находок IgG-антител среди сывороток крови, взятых в периоды 12–15-го и 16–30-го дней заболевания: 61,5 и 80% при тяжелой форме, 70,4 и 77,8% при среднетяжелой и 80 и 100% при легкой (табл. 6).

При выполнении раздела работы, посвященной изучению динамики IgG-антител в разных возрастных группах, в ИФА-IgG были обследованы 334 сыворотки от 251 больного КГЛ, из них 17 (6,8%) больных моложе 19 лет, 80 (31,9%) больных в возрасте от 20 до 39 лет, 107 (42,6%) больных в возрасте от 40 до 59 лет и 47 (18,7%) больных старше 60 лет.

У больных всех возрастных групп показатели титров антител возрастали на 16–30-й день заболевания по отношению к 1–7-му дню. Высокая достоверность различий в титрах наблюдалась в группах до 40 лет (титры антител на 16–30-й день выше, чем на 1–7-й; $p < 0,02$), 40–59 лет (титры на 12–15 и 16–30-й дни выше, чем на 8–11-й день; $p < 0,01$ и $p < 0,02$ соответственно), 60 лет и старше (титры на 12–15-й день выше, чем на 1–7-й день; $p < 0,05$). Достоверность различий отмечали при сравнении титров IgG в разные периоды болезни в разных возрастных группах.

Доля положительных сывороток крови больных в возрасте до 40 лет составляла 60% уже на 8–11-й день, тогда как в группе 40–59 лет в этот период доля серопозитивных сывороток была 35,4%, а в группе 60 лет и старше – 44,4% (табл. 7).

Таким образом, отличия в титрах IgG-антител в разных возрастных группах не связаны с возрастом, однако частота обнаружения IgG-антител у больных в возрасте до 40 лет существенно выше, чем в других группах.

Для выявления особенностей динамики специфических IgG-антител у мужчин и женщин, больных КГЛ, в ИФА-IgG обследовали 325 сывороток от 254 больных КГЛ: 165 (65%) мужчин и 89 (35%) женщин.

Данные динамики титров специфических IgG у женщин и мужчин, больных КГЛ, оказались сходными. Наблюдалось возрастание титров антител с 1–7-й по 16–30-й день заболевания: у женщин от $8,1 \pm 1,4 \log_2$ (1:270) до $10,9 \pm 2,3 \log_2$ (1:1300), у мужчин от $9,4 \pm 2,4 \log_2$ (1:680) до $9,7 \pm 2,3 \log_2$ (1:830). Доля серопозитивных сывороток возрастает на 12–15-й день заболевания до 70,7% у мужчин и 65,4% у женщин, а после 16-го дня у мужчин до 86,5%, у женщин до 83,3% (табл. 8).

Достоверные различия в титрах по критерию Манна–Уитни наблюдали при рассмотрении отдель-

Таблица 6

Динамика титров специфических IgG-антител у больных КГЛ в зависимости от клинической формы заболевания и времени обследования

День от начала заболевания	Форма течения заболевания											
	тяжелая				среднетяжелая				легкая			
	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр
1–7-й	25	20,0	7,9 ± 1,9	1:240	42	18,0	7,4 ± 0,5	1:170	14	23,1	9,0 ± 1,5	1:510
8–11-й	23	30,0	8,0 ± 1,5	1:260	68	48,3	8,6 ± 2,2	1:390	13	58,3	8,8 ± 1,8	1:450
12–15-й	15	61,5	9,6 ± 3,0	1:780	27	70,4	9,6 ± 2,0	1:780	8	80,0	8,6 ± 0,8	1:390
16–30-й	6	80,0	10,4 ± 4,1	1:1400	23	77,8	10,3 ± 2,9	1:1300	6	100	9,8 ± 1,1	1:890
Всего...	69	38,0	9,0 ± 3,4	1:510	160	48,0	9,1 ± 2,3	1:550	41	54,0	9,1 ± 1,4	1:550

Таблица 7

Динамика титров специфических IgG-антител у больных КГЛ в разных возрастных группах в зависимости от времени обследования

День от начала заболевания	Возрастные группы											
	до 40 лет				40–59 лет				60 лет и старше			
	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр
1–7-й	29	27,6	7,9 ± 1,3	1:240	40	22,5	8,9 ± 3,0	1:480	14	28,6	8,1 ± 2,8	1:270
8–11-й	55	60,0	8,9 ± 2,0	1:480	48	35,4	8,3 ± 2,6	1:310	27	44,4	9,4 ± 1,2	1:680
12–15-й	25	68,0	8,9 ± 1,3	1:480	33	66,7	10,0 ± 2,4	1:1000	8	87,5	10,0 ± 1,2	1:1000
16–30-й	25	96,0	9,6 ± 1,9	1:780	18	72,2	10,0 ± 2,6	1:1000	12	83,3	9,4 ± 2,2	1:680
Всего...	134	61,0	9,0 ± 1,9	1:510	139	44,0	9,4 ± 2,7	1:680	61	54,0	9,1 ± 1,9	1:550

ных периодов болезни как у женщин, так и мужчин. У женщин титры IgG на 12–15-й и 16–30-й дни достоверно выше титров антител, выявляемых на 1–7-й день ($p < 0,003$) и 8–11-й день ($p < 0,04$, $p < 0,02$). У мужчин титры IgG на 16–30-й день достоверно выше титров антител, выявляемых на 8–11-й день ($p < 0,01$). Достоверность различий в титрах IgG также имела место между мужчинами и женщинами в разные периоды болезни.

Результаты анализа динамики специфических IgG у мужчин и женщин подтверждают сведения, полученные в ходе анализа суммарных данных антител у всех обследованных больных.

Результаты серологического обследования случаев КГЛ с летальным исходом. Среди 254 больных КГЛ, обследованных при выполнении настоящей работы, было отмечено 5 летальных случаев. В ИФА-IgM и ИФА-IgG нами обследовано 6 проб сывороток крови пяти погибших. У 4 больных заболевание протекало в тяжелой форме с геморрагическим синдромом и у 1 – в тяжелой форме без геморрагического синдрома. 2 умерших были в возрасте от 40 до 59 лет, 2 – старше 60 лет и 1 больной – в возрасте 37 лет. Смертельные исходы наблюдались на 7–12-й день заболевания. Титры IgM-антител у больных с летальным исходом составили: на 6-й день заболевания 1:12 800, на 7-й день – 1:6400, 1:12 800 и 1:51 200, на 8-й день – 1:6400. Одна проба сыворотки, взятая на 5-й день заболевания, оказалась отрицательной. В ИФА-IgG положительный ответ (1:200) наблюдали только в одной сыворотке, взятой на 7-й день болезни.

Результаты обследования в ИФА сывороток крови умерших совпадают с суммарными данными по динамике IgM- и IgG-антител у всех обследованных больных КГЛ: средние геометрические титров IgM на 6–7-й день – $13,1 \pm 2,4 \log_2 (1:8600)$, на 8–9-й день – $13,5 \pm 2,5 \log_2 (1:11 400)$; титры IgG на 1–7-й день – $8,2 \pm 1,8 \log_2 (1:290)$ (см. табл. 1, 5).

По данным F. Burd и соавт. [16] специфические IgM и IgG обнаруживаются с 5-го дня болезни, а начиная с 9-го дня присутствуют у всех выживших больных. В Южной Африке у лиц, переболевших КГЛ, IgM-антитела выявляются на 4, 6, 7, 8 и 9-й дни болезни соответственно в 10, 65, 83, 94 и 100% случаев [14, 20]. Их титры достигали максимального уровня на 2–3-й неделе болезни и обычно исчезали через 4 мес; IgG сохранялись при некотором снижении титров в течение нескольких лет [14, 18, 20, 22]. У больных, умерших на 4–9-й день заболевания, антитела обнаруживались крайне редко [19, 21].

По сведениям Л.С.Карань и соавт. [7], полученным в результате обследования значительного числа сывороток больных КГЛ, чувствительность ОТ-ПЦР относительно ИФА составила 95%, а специфичность – 98%. При этом на 1–8-й день заболевания правильная диагностика КГЛ по выявлению РНК вируса КГЛ была возможной у 95% больных, по выявлению специфических IgM – у 43%. Для обнаружения сероконверсии IgG требовалось обследование парных сывороток не ранее чем на 3-й неделе заболевания.

Предшествующие исследования, посвященные изучению динамики специфических IgM и IgG у больных

Таблица 8

Динамика титров специфических IgG-антител у мужчин и женщин, больных КГЛ, в зависимости от времени обследования

День от начала заболевания	Пол больных							
	мужчины				женщины			
	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр	число проб	процент положительных проб	log ± σ	титр
1–7-й	40	15,0	9,4 ± 2,4	1:680	40	30,0	8,1 ± 1,4	1:270
8–11-й	89	47,2	8,5 ± 2,1	1:360	40	52,5	8,9 ± 2,2	1:480
12–15-й	41	70,7	8,9 ± 1,7	1:480	26	65,4	10,3 ± 2,1	1:1300
16–30-й	37	86,5	9,7 ± 2,3	1:830	12	83,3	10,9 ± 2,3	1:1300
Всего...	207	52,7	9,0 ± 2,3	1:510	118	50,8	9,5 ± 2,2	1:720

КГЛ с разными клиническими формами и в разных возрастных группах подробно рассмотрены в работе А.М. Бутенко [5]. Эти исследования были проведены с использованием РСК и РДПА. Результаты, приведенные в работе, показывают, что независимо от формы болезни у больных КГЛ наблюдается сходная картина динамики КС-антител. Вместе с тем в среднем у больных с легкой и средней формами КГЛ титры КС-антител существенно ниже, чем у больных с тяжелой формой болезни, что выявляется при сравнении средних геометрических титров в период между 30-м и 100-м днем после начала заболевания. Динамика КС-антител у больных в возрасте 21–40, 41–60 и 60 лет и старше практически не различается. Аналогичные данные получены при обследовании сывороток крови в РДПА. У больных с тяжелой формой болезни титры преципитирующих антител выше ($2,7 \log_2$), чем в тот же период у больных со средней ($1,6 \log_2$) и легкой ($1,6 \log_2$) формами КГЛ. Динамика преципитирующих антител у больных КГЛ в возрасте до 40 лет и у больных старше 40 лет практически одинакова.

Наша работа основана на материалах обследования методами ИФА-IgM и ИФА-IgG 338 сывороток крови 254 больных с подтвержденным диагнозом КГЛ, полученных из Ростовской, Астраханской, Волгоградской областей, Калмыкии и Ставропольского края за 2003–2010 гг. По результатам обследования методами ИФА представительного числа сывороток крови больных КГЛ с применением статистической обработки данных впервые проведен анализ динамики обнаружения и титров специфических IgM- и IgG-антител в разные периоды заболевания, при разных клинических формах, в разных возрастных группах, у мужчин и женщин.

В периоды с 1-го по 5, 6, 7-й и начиная с 10-го дня болезни частота выявления IgM-позитивных сывороток составляет соответственно 40,0; 81,8 и 97,1–100%. Средние геометрические титров при этом возрастают от 1:8700 на 1–5-й день, достигают максимального значения 1:22 700 на 14–15-й день, достоверно отличаясь ($p < 0,01$ и $p < 0,05$) от титров на 6–7-й и 8–9-й день. Высокие показатели титров IgM сохраняются в течении месяца от начала заболевания (срок наблюдения).

Специфические IgG в периоды 1–7, 12–15 и 16–18-й дни обнаруживаются соответственно в 24,4; 47,7; 68,7 и 83,6–92,3% случаев. Средние геометрические титров IgG в сроки 1–7; 8–11; 12–15 и 16–30-й дни составляют 1:290; 1:680 и 1:1100. Средний показатель титров 1:960 сохраняется до конца месяца, достоверно на более высоком уровне ($p < 0,01$ и $p < 0,005$), чем на 1–7-й и 8–11-й дни.

Высокая достоверность отличий в титрах IgM-антител (в целом для всех сроков обследования) наблюдается между группами пациентов с легкой (1:15 300) и тяжелой формами КГЛ (1:7600) ($p < 0,05$), а также между группами со среднетяжелой формой в первые 7 дней болезни (1:7100) и на 12–15-й день (1:16 400) ($p < 0,02$). Наличие у больных максимально высоких титров специфических IgM-антител в первые 7 дней заболевания (а также на 12–15-й день) может рассматриваться

как положительный прогностический признак, свидетельствующий о тенденции завершения заболевания в легкой или среднетяжелой форме.

Титры IgM-антител у больных КГЛ в возрастной группе до 40 лет значительно выше, чем в группе 60 лет и старше (соответственно 1:15 300 и 1:6200) ($p < 0,009$), что коррелирует с данными о наиболее частом проявлении тяжелой формы КГЛ у пожилых пациентов.

Разница в титрах и динамике появления специфических IgG-антител в группах больных с разными клиническими формами КГЛ и в разных возрастных группах не существенна. Динамика IgM- и IgG-антител у больных мужчин и женщин также не имеет значительных различий.

При обследовании в ИФА-IgM 6 проб сывороток крови умерших больных КГЛ, взятых на 5–8-й день заболевания, наблюдали положительный ответ антител в 5 пробах в титрах от 1:6400 до 1:51 200. Эти результаты расходятся с данными А. Shepherd и соавт. [17], которые при обследовании в ИФА-IgM и ИФА-IgG 15 больных, умерших от КГЛ, обнаружили специфические антитела только в двух случаях.

Таким образом, по результатам обследования методами ИФА представительного числа сывороток крови больных КГЛ с применением статистической обработки данных впервые проведен анализ динамики обнаружения и титров специфических IgM- и IgG-антител в разные периоды заболевания, при разных клинических формах, в разных возрастных группах, у мужчин и женщин. На основании полученных данных подтверждается и рекомендуется научно-обоснованная схема серологической диагностики КГЛ с обязательным применением ИФА-IgM, а также ИФА-IgG. Метод ИФА-IgG рекомендуется как подтверждающий, но необязательный тест.

Сведения об авторах:

Бутенко Александр Михайлович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского», e-mail: arboelisa@mail.ru; **Ларичев Виктор Филиппович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского», e-mail: vlarichev@mail.ru; **Щелканов Михаил Юрьевич**, доктор биол. наук, канд. физико-математических наук, зав. лаб. экологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского»; **Азарян Алла Рудольфовна**, зав. вирусологической лаб. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области»; **Гришанова Анна Петровна**, врач-вирусолог вирусологической лаборатории ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области»; **Иващенко Екатерина Ивановна**, врач-вирусолог вирусологической лаб. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области»; **Аршба Татьяна Ефимовна**, зам. глав. врача ГУЗ «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М.Ничоги»; **Говорухина Марина Викторовна**, зав. вирусологической лаб. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», e-mail: master@donses.ru; **Асмолова Н.Ю.**, врач-вирусолог вирусологической лаб. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»; **Сиденко И.С.**, врач МБУЗ «Центральная районная больница Сальского района»; **Василенко Надежда Филипповна**, ведущий научный сотрудник ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнад-

зора, e-mail: snipchi@mail.stv.ru, **Русакова Надежда Васильевна**, зав. вирусологической лаб. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», e-mail: virus@fguz-volgograd.ru; **Шишкина Людмила Викторовна**, врач-вирусолог вирусологической лаб. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», e-mail: virus@fguz-volgograd.ru; **Бушкьева Белла Цереновна**, зав. вирусологической лаб. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия», e-mail: bushkueva@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Азарян А.Р., Гришанова А.П., Бутенко А.М.** и др. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 115–20.
2. **Айдинов Г.В., Мороз Н.В., Баташева И.И.** Клинико-эпидемиологическая характеристика крымской геморрагической лихорадки в Ростовской области. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 198–204.
3. **Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Говорухина М.В.** и др. Лабораторная диагностика прородно-очаговых вирусных инфекций в Ростовской области. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 122–4.
4. **Бутенко А.М.** Крымская-конго геморрагическая лихорадка. В кн.: Покровский В. И., Онищенко Г. Г., Черкасский Б. Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. М.: Медицина; 2003: 365–76.
5. **Бутенко А.М.** Материалы по изучению этиологии, лабораторной диагностики и иммунологии крымской геморрагической лихорадки; вопросы экологии вируса-возбудителя. Дис. ... д-ра биол. наук. М.; 1971.
6. **Бутенко А.М., Лецинская Е.В., Львов Д.К.** Крымская геморрагическая лихорадка. Вестник РАЕН, 2002; 2: 41–9.
7. **Карань Л.С., Платонов А.Е., Смирнова С.Е.** и др. Генетические исследования при КГЛ: от диагностики до молекулярной эпидемиологии. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 57–61.
8. **Леоненко Н.В., Судьбина Л.В.** Современное состояние природного очага крымской геморрагической лихорадки в Ростовской области. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 128–32.
9. **Лобанов А.Н., Савченко С.Т., Смелянский В.П.** и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Волгоградской области. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 132–6.
10. **Прохоров Ю.В., Розанов Ю.А.** Теория вероятностей (основные понятия, предельные теоремы, случайные процессы). М.: Наука; 1973.
11. **Тутубалин В.Н.** Теория вероятностей и случайных процессов. М.: Издательство МГУ; 1992.
12. **Черенова Л.П., Чалов В.В., Галимзянов Х.М.** и др. Современные особенности клиники крымской геморрагической лихорадки. В кн.: Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии «Арбовирусы» и Научно-практической конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Астрахань, 17–20 окт. 2006 г. М., 2007: 190–4.
13. **Ширяев А.Н.** Вероятность. М.: Наука; 1989.
13. **Burt F.J., Leman P.A., Abbott J.C., Swanepoel R.** Serodiagnosis of Crimean Congo hemorrhagic fever. Epidemiol. and Infect. 1994; 113(3): 551–62.
14. **Burd F.J., Paweska J.T., Swanepoel R.** Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Ergonul O., Whitehouse Ch., eds. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Springer; 2007: 131–41.
15. **Burt F.J., Swanepoel R., Braack L.E.** Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. Epidemiol. and Infect. 1993; 111(3): 547–57.
16. **Meegan J.M., LeDuc J.W.** Enzyme immunoassay. In: Ho Wang Lee, Dalrymple J.M., eds. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. Seoul; 1989: 83–7.
17. **Schawarz T.F., Nsanze H., Longson et al.** Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996; 55: 190–6.
18. **Shepherd A.J., Swanepoel R., Leman P.A.** Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Rev. Infect. Dis. 1989; 11(Suppl. 4): 801–6.
19. **Swanepoel R.** Crimean-Congo haemorrhagic fever. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C., eds. Infectious diseases of livestock. Oxford: Oxford University Press; 1994; 1: 723–9.
20. **Tarantola A., Nabeth P., Tattevin P., Michelet C., Zeller H.** Incident Management Group (2006). Lookback exercise with imported Crimean-Congo hemorrhagic fever, Senegal and France. Emerg. Infect. Dis. ; 12: 1424–6.
21. **Zeller H.** Laboratory diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic fever. In: Ergonul O., Whitehouse Ch., eds. Crimean-Congo Hemorrhagic fever. Springer; 2007: 233–43.

Поступила 22.03.13

© О.В. КОРОЧКИНА, А.М. РЮМИН, 2013

УДК 616.36-002.2-022-08

О.В. Корочкина, А.М. Рюмин

ОПТИМИЗАЦИЯ ТАКТИКИ ВЕДЕНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, 603022, Нижний Новгород, ул. Барминская, 8а

Изучено прогностическое значение характеристики больных (пол, возраст, доза инфекта, наличие привычных интоксикаций) и вируса (репликативная активность, генотип, вирусная нагрузка, вирусная кинетика) при естественном течении ХГС и вероятности достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) в результате противовирусной терапии (ПВТ). Было проанализировано естественное течение ХГС у 100 больных и эффективность ПВТ у 68 больных ХГС. Установлены факторы, определяющие неблагоприятное течение ХГС (мужской пол, возраст в момент инфицирования старше 30 лет, инфицирование при гемотрансфузиях или употреблении наркотиков, наличие привычных интоксикаций, генотип вируса 3а, а также наличие а/HCVns3 и а/HCVns5). Выявлены факторы, определяющие высокую вероятность достижения УВО. Рекомендуется проведение ПВТ независимо от прогноза естественного течения ХГС.

Ключевые слова: гепатит С, факторы прогрессирования, тактика ведения