

ВИРУСНЫЕ И ТРОПИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:578.833]-078.33

Ларичев В.Ф.¹, Козлова А.А.¹, Сайфуллин М.А.², Хуторецкая Н.В.¹, Шкинев В.М.¹, Бутенко А.М.¹

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭНДЕМИЧНЫХ ДЛЯ РОССИИ И ЗАВОЗНЫХ ТРОПИЧЕСКИХ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; ²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» ДЗМ, 123367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 63

Нами разработаны и апробированы тест-системы ИФА для серодиагностики большинства эндемичных для России арбовирусных инфекций и некоторых завозных тропических заболеваний. Их использование позволило в 1999 г. установить значение вируса лихорадки Западного Нила (ЛЗН) в этиологии вспышки ЛЗН в южном регионе России, затем в Воронежской и Тульской областях. С 1999 по 2014 г. по данным Роспотребнадзора, в РФ было диагностировано 2284 случая ЛЗН и 1725 случаев КГЛ. В 2012–2014 гг. специфические IgG- и нейтрализующие антитела к вирусу ЛЗН обнаружены у населения Южного и Черноземного регионов России. Данные обследования жителей Татарстана, Тверской, Рязанской, Калужской, Курской и Вологодской областей оказались отрицательными. В 2000 г. впервые выявлены случаи КГЛ в Волгоградской области, а также Калмыкии и Дагестане. Применение тест-систем ИФА-IgM позволило выявить случаи лихорадок Синдбис, Батаи, Тягиня, Инко, москитных лихорадок, Укуньемы и Бханджеа. В период 2009–2014 гг. было верифицировано 190 завозных случаев лихорадок денге, Чикунгунья, ЗН, москитных лихорадок и японского энцефалита среди лиц, вернувшихся из поездок в тропические страны.

Ключевые слова: диагностические тест-системы ИФА; серодиагностика арбовирусных инфекций.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (6): 44–46.

Larichev V.F.¹, Kozlova A.A.¹, Saifullin M.A.², Khutoretskaia N.V.¹, Shkinev V.M.¹, Butenko A.M.¹

ELISA DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS, SERODIAGNOSIS OF ARBOVIRAL INFECTIONS

¹The N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and microbiology, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology, 18, Gamaleya str., Moscow, Russian Federation, 123098

²Infectious Clinical Hospital No1, 63, Volokolamskoe shosse, Moscow, Russian Federation, 123367

There are developed and tested by ourselves ELISA kits for serodiagnostics of most endemic to Russia arboviral infections and some imported tropical diseases. Their application allowed in 1999 to set the value WN virus in the etiology of outbreaks of WN fever in the southern region of Russia, then in Voronezh and Tula regions. From 1999 to 2014, according to the data of Russian Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Russia there were diagnosed 2284 cases of WN fevers and 1725 cases of CCHF. In 2012–2014 specific IgG and neutralizing antibodies to the WN virus were detected in the population of the Southern and Black earth regions of Russia. Data of the examination of residents' sera from Tatarstan, Tver, Ryazan, Kaluga, Kursk and Vologda regions were proved to be negative. In 2000 there were revealed first cases of CCHF in the Volgograd region, Kalmykia and Dagestan also. The application of ELISA-IgM kits allowed to reveal cases of Sindbis, Batai, Tahyna, Inkoo, sandfly fevers, Ukuniemi and Bhanja. During the period of 2009–2014 there were verified 190 imported cases of dengue fever, Chikungunya, WN fever, sandfly fevers, and Japanese encephalitis among persons returning from travel in tropical countries.

Key words: ELISA kits; serodiagnostics of arboviral infections.

For citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(6): 44–46. (In Russ.)

For correspondence: Larichev V.F., mail: vlaritchev@mail.ru

Received 01.10.15

Арбовирусы – это экологическая группа вирусов позвоночных животных, передающихся естественным хозяевам и человеку через укусы кровососущих членистоногих. Общее число арбовирусов в мире составляет более 600. По крайней мере 150 из них известны как возбудители заболеваний человека.

Для корреспонденции: Ларичев Виктор Филиппович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», e-mail: vlaritchev@mail.ru

В странах СНГ (включая Россию) установлена циркуляция более 50 арбовирусов. Для 21 вируса установлена патогенность для человека (8 из них вызывают лихорадочные гриппоподобные заболевания; 4 сопровождаются сыпью, артритами и артралгиями; 13 протекают с симптомами поражения ЦНС). Среди эндемичных зоонозных инфекций наибольшее значение в РФ имеют клещевой энцефалит (КЭ), геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, лихорадка Западного Нила (ЛЗН), крым-

ская геморрагическая лихорадка (КГЛ) и, очевидно, заболевания группы калифорнийского энцефалита. Проблема диагностики малоизученных арбовирусных заболеваний связана главным образом с отсутствием качественных диагностических препаратов, доступных для применения в практических лабораториях.

В лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России разработаны, охарактеризованы, стандартизированы и нашли практическое применение следующие экспериментальные иммуноферментные (ИФА) тест-системы: а) для выявления специфических IgM- и IgG-антител в сыворотках крови людей к вирусам Синдбис и Чикунгунья (сем. *Togaviridae*), Западного Нила (ЗН), японского энцефалита (ЯЭ), желтой лихорадки (ЖЛ), денге, Усуту, клещевого энцефалита (сем. *Flaviviridae*), Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), Тягиня, Инко, Батаи, неаполитанской и сицилийской москитной лихорадки, Укуниема, Бханджа (сем. *Bunyaviridae*) и Дхори (сем. *Orthomyxoviridae*); б) для серологической идентификации штаммов и обнаружения антигенов перечисленных эндемичных и актуальных для РФ тропических арбовирусов (денге, Чикунгунья, ЛЗН, ЯЭ, ЖЛ, москитных лихорадок) в экспериментальных, клинических и полевых материалах; в) для выявления IgG-антител к вирусам восточного, западного и венесуэльского энцефалита лошадей (сем. *Togaviridae*) в сыворотках крови лошадей; г) для выявления IgG-антител к вирусам ККГЛ и Батаи в сыворотках крови овец.

Существенный прогресс в технологии приготовления ИФА-диагностикумов во многом связан с внедрением нового мембранного способа получения пероксидазных конъюгатов, который используется в лаборатории уже более десяти лет.

Конъюгаты с пероксидазой являются важным компонентом большинства коммерческих иммуноферментных тест-систем. Наиболее распространенный на сегодняшний день метод конъюгации (мечения пероксидазой) с помощью периодатного окисления, который был предложен Р.К. Nakane и А. Kawaoi (1974 г.).

Использованный в нашей работе новый способ приготовления пероксидазных конъюгатов основывается на использовании нанотехнологических методов, в частности, применении мембран с известной наноструктурой и размерами пор. Предложенная технология предусматривает замену диализа и хроматографии на ультрафильтрацию в ячейках. На 1-й стадии (активации пероксидазы с помощью NaIO_4) диализ или хроматография на колонке с носителем G-25, заменяется на фильтрацию через различные типы мембран (например, полисульфоновые или ацетилцеллюлозные и др.), а также ядерные фильтры с порами различной формы (цилиндрические, конусообразные и др.) с близким размером пор.

На 2-й стадии (образования конъюгата с альдегидпероксидазой) диализ и хроматография на колонке с носителем G-200 также заменяется на фильтрацию через мембраны.

Мембранный способ имеет преимущество перед методом гельфильтрации, заключающееся в простоте технологии и экономичности, что дает возможность получать высокоактивный и специфичный продукт как в препаративных, так и промышленных количествах.

Разработанные ИФА-тест-системы для детекции специфических IgM-, IgG-антител и антигенов вирусов ККГЛ и ЗН прошли успешные испытания в ГИСК им. Л.А. Тарасевича и рекомендованы к регистрации в РФ Комитетом медицинских иммунобиологических препаратов (протокол № 6 от 26.06.03 г.).

На ИФА-тест-системы для специфической диагностики ЛЗН в 2012 г. получено регистрационное удостоверение (ФСР 2012/13840), в соответствии с чем они разрешены к применению на территории РФ и внедрены в коммерческое производство ЗАО "Биосервис".

В течение 1999–2009 гг. в ходе программы по диагностике заболеваний, вызываемых вирусами Синдбис, Чикунгунья, ЗН, КЭ, денге, ЯЭ, ЖЛ, Тягиня, Инко, зайца-беляка, Батаи, ККГЛ, Укуниема, Дхори и Бханджа практическим и научным лабораториям РФ были предоставлены 4174 тест-системы: 2074 набора для выявления специфических IgM-антител в сыворотках крови больных людей, 911 для выявления IgG-антител и 1117 для детекции антигенов арбовирусов. Альтернативные отечественные коммерческие препараты для диагностики этих инфекций (за исключением КЭ, ЛЗН и КГЛ) в настоящее время отсутствуют, зарубежные тест-системы для диагностики ЛЗН и лихорадки денге не нашли применения в практических лабораториях РФ.

Наличие в лаборатории широкого спектра диагностических ИФА-тест-систем позволило в 1999 г. впервые установить значение вируса ЛЗН в этиологии эпидемии ЛЗН в южном регионе России (Астраханская, Волгоградская области и Краснодарский край), в 2010 г. расшифровать этиологию вспышки ЛЗН в Воронежской области, в 2012 г. выявить первые случаи ЛЗН в Тульской области.

В 2000–2001 гг. впервые были выявлены случаи КГЛ в Волгоградской области (27), Калмыкии (12) и Дагестане (9), что явилось доказательством значительного расширения ареала этой тяжелой инфекции.

С 1999 по 2014 гг., по данным Роспотребнадзора, в РФ было диагностировано 2284 случая ЛЗН и 1725 случаев КГЛ с применением в основном экспериментальных ИФА-тест-систем лаборатории биологии и индикации арбовирусов и коммерческих диагностикумов ЗАО "Биосервис".

В результате использования наших наборов ИФА-IgM в 1997–2010 гг. в южных регионах России было выявлено 52 случая малоизученных арбови-

русских инфекций, этиологически связанных с вирусами: Синдбис (7), Батаи (6), Тягиня и Инко (22), москитных лихорадок Неаполь (1) и Сицилия (4) (последние были впервые верифицированы в РФ), Бханджа (4) (впервые в РФ) и Укуниими (8) (впервые в мире).

При обследовании методом ИФА-IgG сывороток крови доноров – жителей Южного региона страны были обнаружены G-антитела к вирусам Синдбис, Батаи, Тягиня, Инко, Укуниими с частотой от 0,8 до 8,0%.

С целью изучения иммуноструктуры населения европейской части территории России методами ИФА-IgG и реакции нейтрализации на специфические антитела к вирусу ЛЗН в течение 2011–2015 гг. было обследовано 5883 сыворотки крови жителей 17 регионов европейской части России от Краснодарского и Ставропольского краев до Вологодской области.

В 2012–2014 гг. специфические IgG- и нейтрализующие антитела к вирусу ЛЗН были обнаружены в сыворотках крови жителей Астраханской области (19,6% из 657), Ставропольского края (5,4% из 56), Краснодарского края (4,5% из 243), а также Воронежской (1,6% из 128), Тульской (1,5% из 400), Липецкой (0,9% из 327), Саратовской (0,8% из 1448), Тамбовской (0,7% из 1023) областей. Единичные положительные находки антител в сыворотках крови жителей Московского региона могут быть связаны с инфицированием серопозитивных лиц во время пребывания в эндемичных регионах. Результаты обследования жителей Татарстана, Тверской, Калужской, Курской, Ульяновской, Рязанской и Вологодской областей оказались отрицательными.

Данные серологического обследования населения эндемичных территорий (Астраханской области, Ставропольского и Краснодарских краев, Тульской, Воронежской и Саратовской областей) в целом коррелируют с показателями заболеваемости и известной продолжительностью эпидемиологической активности ЛЗН на этих территориях.

В период 2009–2014 гг. с использованием ИФА-IgM и ИФА-IgG было верифицировано 190 завозных случаев лихорадок: денге (169), Чикунгунья (10), ЗН (6), москитных (3), ЯЭ (1) среди лиц, госпитализированных в Инфекционную клиническую больницу № 1 Москвы после возвращения из поездок в тропические страны.

Представленные данные свидетельствуют об актуальности проведения дальнейших исследований по изучению роли в патологии человека эндемичных и актуальных для РФ тропических арбовирусов и необходимости создания эффективной системы специфической диагностики этих инфекций.

Сведения об авторах:

Козлова Алина Александровна, науч. сотр. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», e-mail: arboelisa@mail.ru; **Сайфуллин Мухамад Абдулфаритович**, врач-инфекционист, зав. отд-нием ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» ДЗМ, e-mail: dr_saifullin@mail.ru; **Хуторецкая Наталья Владимировна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», e-mail: arboelisa@mail.ru; **Шкинев Валерий Михайлович**, доктор хим. наук, науч. сотр. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»; e-mail: vshkinev@mail.ru; **Бутенко Александр Михайлович**, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. индикации арбовирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», e-mail: arboelisa@mail.ru

Поступила 01.10.15