

Н. Ф. Василенко, В. И. Ефременко, Е. Н. Афанасьев, Е. И. Еременко, О. И. Цыганкова,
О. И. Вышемирский, А. Е. Платонов, Л. С. Карань

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ И ДЕТЕКЦИИ ЕЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ

ФГУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Разработаны сочетанные методы экспресс-диагностики крымской геморрагической лихорадки с помощью селективного концентрирования вируса на поверхности магнитных иммунных сорбентов (МИС) и последующего проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией. Показано, что применение МИС в сочетании с экспрессными методами диагностики (ИФА и ПЦР) повышает чувствительность этих методов, одновременно сокращая время проведения исследований за счет ускорения манипуляций и исключения ряда этапов в ходе анализов, что способствует более раннему проведению эффективных противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: крымская геморрагическая лихорадка, вирус, антиген, магнитные иммунные сорбенты, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, сочетанный метод

Combined procedures have been developed for the rapid diagnosis of Crimean hemorrhagic fever by selective viral concentration onto the surface of magnetic immune sorbents (MIS), followed by enzyme immunoassay (EIA) and reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR). The use of MIS in combination with rapid diagnostic techniques (EIA and PCR) was shown to enhance their sensitivity by simultaneously reducing the time of studies through the acceleration of manipulations and the exclusion of a number of stages during analyses, which promoted earlier effective anti-epidemic measures.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, virus, antigen, magnetic immune sorbents, enzyme immunoassay, reverse-transcription polymerase chain reaction, combined procedure.

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) вновь становится актуальной проблемой здравоохранения в связи со значительным ростом заболеваемости за последние 6 лет в южных регионах России. Об этом свидетельствует и то, что эта опасная инфекция зарегистрирована в 7 регионах Южного федерального округа (ЮФО), последним из которых является Республика Ингушетия, где отмечена самая высокая летальность — 75%. За эти годы в России КГЛ заболели 432 человека, 36 из них умерли. На территории Ставропольского края зарегистрировано 204 случая КГЛ, из них 17 (8,3%) с летальным исходом. Высокая летальность особенно часто связана с запоздалой или неправильной диагностикой заболевания.

В связи с этим возникает необходимость повышения качества выполнения и усиления всех этапов комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий, в которых лабораторная диагностика заболеваний и поиск источников инфекции занимают одну из ключевых позиций.

Целью наших исследований явилась разработка сочетанных методов экспресс-диагностики КГЛ и

детекции ее возбудителя в полевом и биологическом материале с помощью селективного концентрирования вируса КГЛ на поверхности магнитных иммунных сорбентов (МИС) и последующего проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Материалы и методы

Материалом для исследований служили клещи, собранные в природных очагах КГЛ Ставропольского края и других регионов ЮФО, и пробы сывороток крови, полученные от больных с подозрением на заболевание КГЛ. Выявление антигена вируса КГЛ проводили методом ИФА с помощью диагностических тест-систем, изготовленных в НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН (Москва) и ЗАО "Вектор-Бест" (Новосибирск). Результаты анализа учитывали на регистрирующем спектрофотометре "Мультискан". Для обнаружения специфической РНК использовали диагностическую тест-систему "АмплиСенс КГЛ" (ЦНИИЭ, Москва).

Клещей для исследования группировали в пулы, учитывая при этом видовую принадлежность, фазу развития, место сбора, вид хозяина (крупный и мелкий рогатый скот, ежи, зайцы, мелкие грызуны, птицы и др.) Из клещей готовили суспензии в объеме 200–1500 мкл согласно методическим рекомендациям [3].

Вирусофорность клещей определяли отношением числа положительных пулов к общему количеству исследованных пулов.

Композиционные органокремнеземные МИС получали по методу И. В. Жарниковой и соавт. [4]. Биологическим сырьем при конструировании диагностических препаратов (МИС и иммунопероксидазный конъюгат) для детекции вируса КГЛ служили мышинные иммунные асцитические жидкости (ИАЖ). Контроль титра специфических антител к вирусу КГЛ в ИАЖ проводили в реакции связывания комплемента [10]. Иммуноглобулины класса G выделяли методом двойного осаждения сернокислым аммонием [9]. Иммунопероксидазный конъюгат получали методом периодатного окисления [11].

Селективное концентрирование исследуемого патогена на поверхности МИС осуществляли следующим образом: во флаконы (типа пенициллиновых) вносили 50 мкл 10% взвеси МИС и имеющийся объем исследуемого материала (сыворотки крови или суспензии клещей). Инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем МИС трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,4 с добавлением 0,05% твина-20, удерживая постоянным магнитом сорбент на дне флакона. Далее ресуспендировали МИС в 200 мкл ФСБ и делили пробу пополам для дальнейшего проведения ИФА и ОТ-ПЦР.

При проведении сочетанного метода МИС + ИФА аналогичную операцию проводили с контролями, при этом в качестве положительного контроля использовали инактивированный антиген вируса КГЛ, полученный в НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, в качестве отрицательного – ФСБ.

Далее во флаконы добавляли по 100 мкл иммунопероксидазного конъюгата, выдерживали 20 мин при 37°C, затем отмывали 5–6 раз, как описано выше, после чего вносили 200 мкл субстратиндикаторного раствора во флакон с отрицательным контролем. Продолжительность инкубации МИС с хромогеном в опытах устанавливали, измеряя время от добавления субстратиндикаторного раствора

во флакон с отрицательным контролем до момента, когда содержимое флакона начинало приобретать легкий желтый цвет. Цветная реакция развивалась в течение 1–3 мин. После этого раствор в количестве 100 мкл переносили в лунку микропланшета с помощью автоматического дозатора (осторожно, не захватывая сорбент) и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 2М раствора серной кислоты. Время инкубации МИС с хромогеном в отрицательном контроле и опыте должно быть строго одинаковым. Учет результатов проводили на регистрирующем спектрофотометре "Мультискан" при длине волны 492 нм. Величина оптической плотности (ОП) положительного контроля составляла не менее 2,0 ед. опт. пл.. Положительными считали пробы, если их ОП в 2,1 раза и более превышала ОП отрицательного контроля. Продолжительность анализа составляла 45–50 мин.

При проведении ПЦР РНК выделяли из 100 мкл суспензии клещей в соответствии с инструкцией к набору для выделения из тест-системы "Ампли-Сенс КГЛ" (ЦНИИЭ, Москва). При проведении сочетанного метода МИС+ПЦР РНК выделяли из 100 мкл суспензии МИС с использованием набора "РибоСорб" (ЦНИИЭ, Москва). С препаратами РНК незамедлительно проводили обратную транскрипцию и затем ПЦР с полученной кДНК в соответствии с инструкцией к тест-системе "Ампли-Сенс КГЛ" (ЦНИИЭ, Москва).

Результаты и обсуждение

В связи с тем что трансмиссивный путь передачи возбудителя является ведущим при КГЛ, исследование клещей – переносчиков и резервуара вируса этой инфекции представляет особый интерес для изучения данного природно-очагового заболевания человека. Резервуаром вируса являются многие виды пастбищных клещей, паразитирующих на крупном и мелком рогатом скоте, диких грызунах, насекомоядных, птицах, главным образом семейства врановых, и передающих вирус своему потомству трансвариальным и трансфазовым путем. Основным переносчиком вируса КГЛ является клещ *Hyalomma marginatum*.

С 2001 по 2004 г. нами проведено исследование иксодовых клещей, собранных в 26 административных районах Ставропольского края, а также на территориях Дагестана, Калмыкии, Кабардино-Балкарии, Карачаево-Черкессии, Северной Оссе-

Таблица 1

Результаты серологического исследования клещей на наличие антигена вируса КГЛ в некоторых регионах юга России за 2001–2004 гг.

Год	Количество исследованных клещей	Количество пулов	Количество положительных пулов по видам							
			Hyalomma			Rhipicephalus rossicus	Dermacentor marginatus	Ixodes ricinus	Boophilus annulatus	Haemaphysalis otophila
			marginatum	anatolicum	scupense					
2001	8 118	666	31	1	0	0	1	0	0	0
2002	12 996	1073	48	0	0	0	0	0	0	0
2003	8 338	477	26	0	0	0	2	1	0	0
2004	18 630	831	45	0	5	1	5	0	3	1
Всего...	48 144	3067	150	1	5	1	8	1	3	1

тии—Алании и Ингушетии, расположенных в полупустынной, степной, лесостепной и предгорной ландшафтно-географических зонах.

При исследовании методом ИФА 48 144 особей клещей, объединенных в 3067 пулов, антиген вируса КГЛ обнаружен в 170 пробах суспензий 8 видов иксодовых клещей, что составило 5,5% (табл. 1).

Циркуляция вируса КГЛ установлена практически на всей территории Ставропольского края и в некоторых районах Калмыкии, Дагестана, Карачаево-Черкессии и Ингушетии.

Известно, что одним из основных факторов, повышающих чувствительность ИФА, является твердая фаза. В экспресс-иммуноанализах композиционные МИС, представляющие собой заданную геометрическую структуру с активированной поверхностью и иммобилизованными иммуноглобулинами, выступают в качестве твердой фазы, значительно увеличивая специфичность и чувствительность анализа за счет селективного концентрирования инфекционного агента на своей поверхности. Это было установлено во время исследования полевого материала при выявлении возбудителей бактериальных инфекций [2, 4]. Мы использовали алюмосиликатные МИС для детекции вируса КГЛ в суспензиях клещей и пробах крови людей и животных.

Для проведения эксперимента использованы образцы суспензий клещей из коллекции, созданной в вирусологической лаборатории Ставропольского НИПЧИ следующим образом: после проведения ИФА остаток суспензий клещей перенесли в пластмассовую пробирку с плотно закрывающейся крышкой, этикетировали и хранили в низкотемпературном холодильнике при -70°C . В первую очередь в работу брали образцы, которые показывали сомнительный результат в ИФА. Затем отбирали и исследовали пулы, полученные из клещей *Hyalomma marginatum*, собранных в районах, наиболее неблагополучных по КГЛ. Далее анализировали суспензии других видов иксодовых клещей. Всего из коллекции сочетанным методом МИС + ИФА исследован 1071 пул клещей.

Результаты исследований показали, что за счет селективного концентрирования специфического антигена на поверхности МИС те пробы клещей, которые показывали сомнительный результат в ИФА в полистироловых планшетах, в разработанном нами сочетанном методе МИС + ИФА были положительными. Наряду с этим выявлены положительные пробы среди тех, которые давали отрицательный результат при исследовании в ИФА с помощью экспериментальных и коммерческих тест-систем. В табл. 2 представлены результаты сравнительного анализа суспензий клещей методами ИФА и МИС + ИФА.

В 2004 г. нами проведены параллельные исследования свежеприготовленных суспензий клещей в сэндвич-варианте ИФА и сочетанном методе МИС + ИФА. Селективное концентрирование суспензий на МИС дало возможность обнаружить антиген вируса КГЛ в 87 пробах, в то время как в ИФА без применения МИС выявлено 56 антигенсодержащих проб. Таким образом, подтверждено нали-

Таблица 2

Результаты сравнительного исследования клещей методами ИФА и МИС + ИФА

Год	Количество клещей	Количество пулов	Количество положительных пулов		Вирусофорность клещей в Ставропольском крае, %	
			ИФА	МИС + ИФА	ИФА	МИС + ИФА
2001	2304	128	12	21	9,4	16,4
2002	7528	614	47	59	7,7	9,6
2003	5639	329	26	34	7,9	10,3
2004	17 402	732	56	87	7,7	11,9

чие антигена вируса КГЛ в 56 суспензиях клещей и дополнительно выявлена 31 положительная проба, в том числе *H. marginatum* — 14 проб, *D. marginatus* — 9, *H. scupense* — 5, *Rh. rossicus* — 3 пробы.

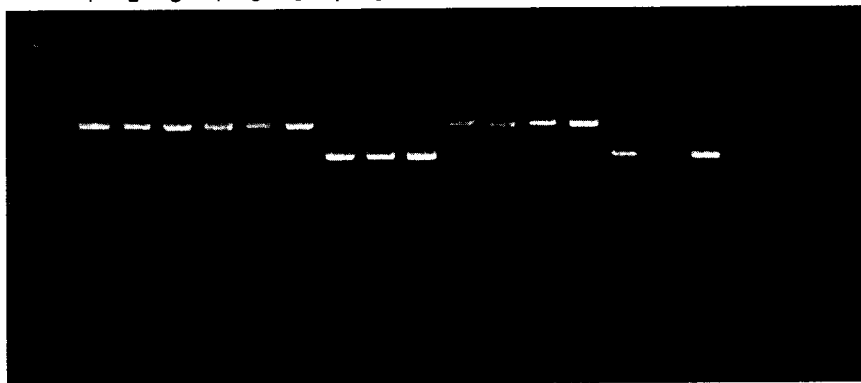
Эффективность применения сочетанного метода МИС + ИФА показана также при исследовании проб крови от двух трупов людей, умерших предположительно от КГЛ. В одной из проб методом ИФА был обнаружен антиген вируса КГЛ (величина ОП пробы составила 0,528 ед. опт. пл. при ОП_{крит.} 0,221). Затем проведены селективное концентрирование проб крови на МИС и ИФА. В результате подтверждено наличие антигена в первой пробе: величина ее ОП увеличилась в 2,6 раза (1,347 ед. опт. пл.), а также выявлен антиген вируса КГЛ во второй пробе (ОП 0,596 ед. опт. пл.).

В настоящее время одним из перспективных методов экспресс-анализа на наличие вируса в исследуемом объекте является ПЦР [5, 7]. При использовании в качестве проб клинического материала особых трудностей в подготовке образцов для постановки ПЦР не возникает. Более сложной задачей представляется обработка проб из объектов внешней среды (пробы из очистных сооружений и канализационных стоков, смывы с поверхностей, почва, клещи, комары и т. д.), так как в этом случае необходимо использовать особые методические приемы, позволяющие избавиться от посторонних примесей, находящихся в объектах внешней среды и способных значительно снизить чувствительность анализа [6, 8].

Для устранения этих негативных явлений мы объединили два метода: высокоэффективное избирательное концентрирование инфекционного агента на МИС с последующей ПЦР, применив ряд приемов по адаптации этих методов друг к другу.

Выделение РНК из суспензий клещей, согласно инструкции, осуществляют в два этапа. При выделении РНК из проб, сконцентрированных на МИС, мы использовали только один этап выделения с помощью комплекта "Рибо-сорб", что исключало применение сильнодействующих веществ (фенол, хлороформ) и показывало дополнительное преимущество сочетанного метода детекции МИС + ПЦР. Результаты исследований свидетельствуют о том, что применение МИС при проведении ПЦР-анализа позволяет на этапе подготовки проб путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем вирусом освобождаться от все-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Результаты выявления РНК вируса КГЛ методом ОТ-ПЦР до и после селективного концентрирования проб суспензий клещей на МИС.

1–6 – суспензии клещей до концентрирования на МИС; 7–12 – суспензии клещей после концентрирования на МИС; 13 – ОКО ВКО (к-) – выделения; 14 – ПКО (к+) – выделения; 15 – ОКО (к-) – амплификации; 16 – КДНК (к+); 17 – L. d. 100 – маркер молекулярной массы.

возможных примесей, тем самым исключая их отрицательное влияние на реакцию и максимально концентрируя искомым антиген. Результаты выявления РНК вируса КГЛ методом ОТ-ПЦР до и после селективного концентрирования проб клещей на МИС представлены на рисунке.

Исследование суспензий клещей, собранных в Республике Ингушетия, где в октябре 2004 г. были впервые зарегистрированы и нами лабораторно подтверждены случаи заболевания людей КГЛ, еще раз показало целесообразность применения МИС. При исследовании суспензий клещей традиционным методом ИФА положительных проб не выявлено, после чего мы провели селективное концентрирование суспензий на МИС с последующей постановкой ИФА. В результате антиген вируса КГЛ обнаружен в 3 пробах клещей *Voophilus annulatus* и 1 пробе *Haemaphysalis otophila*, что составило 20% от общего количества исследованных проб. Методом ОТ-ПЦР в этих суспензиях обнаружена РНК вируса КГЛ.

Ранее на территории ЮФО в клещах этих видов антиген вируса КГЛ не выявлялся. Согласно данным литературы, клещи *V. annulatus* участвуют в поддержании циркуляции вируса КГЛ в природных очагах этой инфекции на территории Болгарии, Армении и республик Средней Азии [1]. Данные, подтверждающие участие клещей *Haem. otophila* в циркуляции вируса КГЛ, в литературе отсутствуют. Таким образом, применение сочетанных методов детекции вируса КГЛ позволило впервые показать, что иксодовые клещи *V. annulatus* и *Haem. otophila* могут играть определенную роль в поддержании природного очага КГЛ на территории юга России.

На основе полученных данных мы разработали алгоритм лабораторного исследования на КГЛ, позволяющий изучать материал от людей, животных и клещей с низкой концентрацией вируса путем селективного концентрирования на МИС и дальнейшего проведения экспрессных методов (ИФА и ПЦР) с целью выявления антигена вируса КГЛ и специфической РНК в сыворотках крови людей в период вирусемии и у клещей постоянно, у всех биологических форм.

Таким образом, применение МИС в сочетании с экспрессными методами диагностики (ИФА и ПЦР) повышает их чувствительность, одновременно сокращая время проведения исследований, что способствует более раннему проведению эффективных противоэпидемических мероприятий.

Выводы

1. Разработаны методологические основы конструирования твердофазных магнитоиммуносорбентных тест-систем для экспресс-диагностики КГЛ и детекции ее возбудителя, имеющих высокую степень разрешения.

2. Разработаны методические приемы по сочетанному применению селективного концентрирования вирусов и их антигенов на МИС с последующим проведением экспрессных методов (ИФА и ПЦР), позволяющие исследовать материал от больных людей или животных с низкой концентрацией вирионов и чувствительностью, превышающей чувствительность традиционных методов, что значительно увеличивает достоверность как положительных, так и отрицательных результатов исследований. При этом значительно сокращается время проведения анализов.

3. Применение сочетанных методов детекции позволило впервые обнаружить вирус КГЛ в пробах иксодовых клещей *Voophilus annulatus* и *Haemaphysalis otophila*, собранных на территории Республики Ингушетия, что свидетельствует об интенсивности эпизоотического процесса в очаге КГЛ, расширении видового состава клещей — источника и резервуара вируса КГЛ, формировании стойкого природного очага КГЛ на территории Ставропольского края и некоторых других регионов юга России и позволяет более обоснованно прогнозировать развитие эпидемиологической обстановки по этой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристова В. А., Колобухина Л. В., Шелканов М. Ю., Львов Д. К. // *Вопр. вирусл.* — 2001. — № 4. — С. 7–15.
2. Афанасьев Е. Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Ростов-н/Д. 2000.
3. Диагностика и изучение природных очагов Крымской геморрагической лихорадки: Метод. рекомендации / Благовещенская Н. М., Кондратенко В. Ф., Зарубина Л. В. и др. — Ростов-н/Д. 1975.
4. Жарникова И. В. Разработка технологии композиционных магнитоиммуносорбентов и конструирование на их основе диагностических тест-систем для иммуноанализа возбудителей чумы и туляремии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь. 2004.
5. Карань Л. С., Штуплин Г. А., Платонов А. Е. // *Клин. лаб. диагн.* — 2003. — № 10. — С. 50–54.
6. Корсуков В. Н., Гаранина С. Б., Куличенко А. Н. и др. // *Материалы Научно-практической конф., посвящ. 100-летию образования противочумной службы России.* — Ставрополь, 1997. — Т. 2. — С. 186.

7. Манзенюк И. Н., Карань Л. С., Шарова И. Н. и др. // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Материалы науч.-практ. конф., Москва, 19—21 окт., 2004 г. — М., 2004. — Т. 1. — С. 336—338.
8. Филиппов Н. И., Тихвинский М. С., Воробьев А. А. и др. // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбил. науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ. (30 нояб. — 1 дек. 1998). — Киров, 1998. — С. 244.
9. Фримель Г. Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1987. — С. 390—395.
10. Casals J. // Methods in Virology / Eds K. Maramorosh, H. Koprowski. — New York, 1967. — Vol. 3. — P. 161—181.
11. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 22, N 4. — P. 1084—1091.