

Тяжелый острый респираторный синдром

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.24-022:578.834.1]-07:577.21

Г. А. Шипулин¹, С. Б. Яцышина¹, В. П. Чуланов¹, М. Ю. Маркелов¹, О. Ю. Шипулина¹, А. Т. Подколзин¹,
Т. С. Астахова¹, А. Шишова¹, Wuchun Cao², Liu Wei², Fan Baochang²

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА, ВЫЗЫВАЮЩЕГО ТЯЖЕЛЫЙ ОСТРЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ

¹ГУ ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ, Научно-производственная лаборатория Федерального научно-методического центра СПИД, Москва, ²Институт микробиологии и эпидемиологии Военно-медицинской академии Министерства обороны Китая, Пекин

Цель исследования. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления РНК коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), определение ее аналитических и диагностических характеристик.

Материалы и методы. В работе использовали 68 вирусных и бактериальных культур 240 образцов клинического материала от людей без симптомов ТОРС, а также 22 образца РНК, полученных от пациентов, поступавших в период эпидемии ТОРС в лечебные учреждения Пекина с диагнозом ТОРС.

Результаты. Специфичность тест-системы, определенная с использованием штаммов коронавируса животных и гетерологичных штаммов вирусов и бактерий, вызывающих острые респираторные и кишечные инфекции, составила 100%. Чувствительность тест-системы во всех рекомендованных видах клинического материала составила $2,2 \cdot 10^3$ геномных эквивалентов рекомбинантной РНК вируса ТОРС в 1 мл исследуемого материала, или 10 ТЦД₅₀/мл вируса ТОРС в вирусосодержащей жидкости. Испытания тест-системы на базе Пекинского института микробиологии и эпидемиологии показали, что диагностическая чувствительность тест-системы "АмплиСенс SARS" на клиническом материале от пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС составила 95%. При этом эффективность выявления в образцах фекалий была выше, чем в образцах мокроты (90 и 40% соответственно).

Заключение. В ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ разработана тест-система "АмплиСенс SARS" для выявления РНК коронавируса, вызывающего ТОРС, методом обратной транскрипции и ПЦР в смывах из носо- и ротоглотки, мазках из носо- и ротоглотки, фекалиях и плазме крови. Тест-система включает реагенты для выделения РНК из клинического материала, получения кДНК на матрице РНК, проведения амплификации участка генома вируса ТОРС и электрофоретического анализа продуктов ПЦР и содержит рекомбинантные положительный и внутренний контрольные образцы, позволяющие контролировать эффективность проведения анализа. Испытания показали хорошие аналитические и диагностические характеристики тест-системы.

Ключевые слова: *Coronaviridae*, тяжелый острый респираторный синдром, полимеразная цепная реакция

G. A. Shipulin, S. B. Yatsyshina, V. P. Chulanov, M. Yu. Markelov, O. Yu. Shipulina,
A. T. Podkolzin, T. S. Astakhova, A. Shishova, Wuchun Cao, Liu Wei, Fan Baochang

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE KIT FOR DETECTION OF SARS-ASSOCIATED CORONAVIRUS RNA

Aim. To develop a diagnostic kit for detection of SARS (severe acute respiratory syndrome)-related coronavirus RNA based on reverse transcription and polymerase chain reaction and to estimate its specificity and sensitivity.

Material and methods. 68 virus and bacterial cultures, 240 clinical samples from people without SARS symptoms and also 22 RNA samples from patients with SARS symptoms received during the epidemic in Beijing were used.

Results. The specificity of the kit was determined using animal coronaviruses and other bacterial and viral strains, causing acute respiratory and intestinal infections, and was shown to be 100%. The sensitivity of the kit in different clinical samples was $2.2 \cdot 10^3$ genome equivalents of recombinant SARS RNA in 1 ml of the specimen. The kit was evaluated in the Institute of Microbiology and Epidemiology of Beijing (China) using SARS-cov viral suspension and clinical samples from patients with suspected SARS. It was shown that the kit was able to detect 10 TCID₅₀/ml of SARS-Cov virus. Testing of clinical samples from patients with suspected SARS showed that diagnostic sensitivity of the kit was 95%. Detection of the SARS-Cov RNA was more effective in feces compared to sputum (90 and 40%, respectively).

Conclusion. The kit "AmpliSens SARS" for qualitative detection of SARS-related coronavirus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR) in nasopharyngeal wash/aspirates, naso/oropharyngeal swabs, plasma, and extract from feces has been developed in the Central Research Institute for Epidemiology of the RF Ministry of Health. The kit contains reagents for RNA isolation and

purification, cDNA synthesis by reverse transcription of RNA, for PCR and for electrophoretic analysis of amplified products. The kit also contains recombinant positive and internal control samples allowing to control efficiency of analysis and showed good analytical and diagnostic characteristics.

Key words: *Coronaviridae, SARS, PCR*

Возникновение в ноябре 2002 г. в Китае эпидемии тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), а затем его молниеносное распространение в ряде других стран заставило ВОЗ предпринять чрезвычайные меры по выяснению этиологии этой болезни, а также разработке средств для ее диагностики, профилактики и лечения. Благодаря этим усилиям в сравнительно короткий срок был установлен, выделен в виде чистой культуры и охарактеризован этиологический агент ТОРС — вирус из семейства коронавирусов, названный SARS-Cov (коронавирус, ассоциированный с ТОРС) [1–3].

Было показано, что вирус ТОРС имеет структуру, характерную для всех представителей семейства, в том числе белково-липидную оболочку с булавовидными выступами, напоминающими корону. Геном коронавируса ТОРС представляет собой однонитевую РНК с позитивной полярностью, длиной около 30 000 пар нуклеотидов (п. н.), имеющую 5'-концевую метилированный Кэп, 6 рамок считывания, кодирующих репликазу и основные структурные белки — S, E, M, N и 5 рамок считывания, кодирующих неструктурные протеины, короткую (32 п. н.) 3'-нетранслируемую область и 3'-концевую поли(А) последовательность [4, 5].

До открытия вируса ТОРС все известные коронавирусы были разделены на 3 серогруппы, включающие около 15 видов. Разделение на эти серогруппы имеет под собой и генетическое основание — филогенетический анализ геномных последовательностей коронавирусов также позволяет выделить 3 основных генотипа, соответствующих основным серогруппам коронавирусов [6]. Вновь идентифицированный коронавирус ТОРС не имеет высокой гомологии с представителями известных ранее групп коронавирусов как по нуклеотидным последовательностям отдельных генов, так и по геному в целом, сохраняя при этом гомологию в функционально значимых консервативных областях, характерных для всех коронавирусов, что позволило отнести все выделенные изоляты вируса ТОРС к 4-й группе коронавирусов [7]. Отсутствие районов высокой гомологии с известными коронавирусами свидетельствует против возможности возникновения вируса ТОРС путем рекомбинации между известными ранее видами внутри семейства.

Коронавирусы инфицируют людей, крупный рогатый скот, свиней, грызунов, кошек, собак и птиц, вызывая широкий спектр болезней, включающих острый респираторный синдром и гастроэнтерит людей, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, инфекционный бронхит кур, инфекционный перитонит кошек и т. д. Среди коронавирусов, инфицирующих животных, периодически отмечалось появление новых вариантов, имеющих нехарактерный тканевый тропизм или более высокую вирулентность [8, 9], что объясняется высоким уровнем мутирования и рекомбинации у коронавирусов [10, 11].

Заболевание, вызываемое SARS-Cov, имеет атипичную для ранее известных респираторных заболеваний человека клиническую картину — инкубационный период от 1 до 10 дней, затем лихорадка с непродуктивным кашлем и быстро развивающаяся пневмония. У части пациентов (по данным J. Peiris и соавт. у 73%) наблюдается диарея. Летальность, по данным различных авторов, составляет от 3,5 до 15%.

Для проведения лабораторной диагностики ТОРС ВОЗ рекомендует использовать иммунологические методы (иммуноферментный анализ — ИФА, непрямую иммунофлюоресценцию), выделение ТОРС-ассоциированного коронавируса в культуре клеток и выявление РНК вируса методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Метод молекулярной диагностики с использованием ОТ-ПЦР имеет преимущество, так как позволяет проводить раннее выявление возбудителя и тем самым предупреждать его дальнейшее распространение. Кроме того, в этом случае проведение диагностических мероприятий обеспечивает меньший риск заражения персонала лабораторий, чем при проведении культуральных исследований.

Данная работа освещает этапы разработки и испытания первой отечественной тест-системы для диагностики ТОРС методом ПЦР.

Материалы и методы

В работе использовали следующие штаммы и клинические изоляты.

Штаммы коронавируса — коронавирус кошек — FC0 и FC1, коронавирус собак — CCV, коронавирус, вызывающий инфекционный бронхит кур — ИБК "Чапаевский", ИБК МВА-6, ИБК Н-120, ИБК АМ, М-41. Штаммы ротавируса — группа А — ротавирус человека SA-11, WA, DS-1, ротавирус быков, ротавирус свиней; штамм ротавируса человека группы С. Штаммы астровируса человека, типы 1, 4, 5, 6, 7. Штаммы норовируса, генотипы 1 и 2. Штаммы аденовируса человека, типы 3, 5, 7, 37, 40. Штаммы вируса гриппа (тип А), выделенные от животных: Индюк/Висконсин/1/66, Индюк/Онтарио/6118/68, утка/Германия/1215/73, утка/Чехословакия/56, утка/Украина/1/63, цыпленок/Германия/Н/49, Лошадь-1/Кембридж/63, свинья/Айова/15/30. Штамм вируса гриппа человека, тип В. Штамм респираторно-синцитиального вируса, тип А. Штамм вируса парагриппа 1 (Сендай), типы 2 и 3. Штаммы энтеровирусов — Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio 1, 11, 111. Бактериальные штаммы: E. coli, Salmonella spp., Haemophilus influenzae, тип В. Клинические изоляты: коронавирус человека групп OC43 и E229; респираторно-синцитиальный вирус типа В; вирус парагриппа, тип 4; риновирус, типы 1В и 2; 1 клинический изолят коронавируса от кошки, больной инфекционным перитонитом. Штаммы предоставлены ГИСК им. Л. А. Тарасевича и ФГУ Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов — Центром качества ветеринарных препаратов и кормов (ФГУ ВГНКИ). Использованный в работе штамм вируса ТОРС был выделен от пациента во время вспышки заболевания в Пекине в период с марта по май 2003 г. Вирус был выделен в культуре клеток Vero и его концентрация вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), выраженная в тканевых цитопатических дозах (ТЦД₅₀), была определена в соответствии со стандартным протоколом.

Для оценки специфичности тест-системы использовали мазки из носо- и ротоглотки от пациентов с диагнозом ОРЗ, по-

лученные из Детской инфекционной клинической больницы № 5 Москвы — 70 образцов, фекалии от пациентов с острыми кишечными инфекциями (ОКИ), находившихся на лечении в Детской инфекционной клинической больницы № 5, Тушинской детской городской больницы и Центральной клинической больницы Москвы — 150 образцов, плазму крови доноров — 20 образцов.

Для проведения испытаний тест-системы "АмплиСенс-SARS" на клинических образцах от пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС применяли 22 препарата РНК, ранее выделенных из клинического материала (фекалии и мокрота) пациентов, поступавших в период эпидемии ТОРС в лечебные учреждения Пекина с диагнозом ТОРС. Для выделения вирусной РНК из этого клинического материала использовали набор фирмы "Qiagen" (RNeasy Mini Kit). Выделенную РНК хранили при температуре -70°C . ПЦР проводили на амплификаторе "GeneAmp PCR System 2400" ("Perkin Elmer", США).

В работе применяли реактивы производства ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ. Все этапы анализа подробно описаны в инструкции по применению тест-системы "АмплиСенс-SARS". Для выделения нуклеиновых кислот использовали набор "Рибо-сорб" (ЦНИИ эпидемиологии), в основе которого лежит метод сорбции нуклеиновых кислот на силикагеле [12]. Для проведения контроля эффективности анализа были сконструированы рекомбинантные положительный и внутренний контрольные образцы, введенные в тест-систему. Положительный контрольный образец РНК представляет собой бактериофаг ms2, содержащий рекомбинантную молекулу РНК, включающую синтезированный фрагмент коронавируса ТОРС и последовательность гена gag, наличие которой позволяет определять концентрацию стандартного образца предпрятия — положительного контрольного образца (СОП ПКО) SARS-гес с использованием количественного теста AMPLICOR HIV MONITOR (Roche). Фрагмент коронавируса ТОРС размером 440 п. н., включенный в ПКО, был получен с помощью лигирования синтезированных олигонуклеотидов. Сконструированная последовательность была клонирована в pET20b, содержащую клонированные фрагменты генома фага ms2, необходимые для упаковки частиц фага, и последовательность гена gag ВИЧ 100% гомология с аналогичными последовательностями РНК вируса ТОРС (AY274119.3 — TOR2 и AY291315.1 — Frankfurt) была подтверждена с помощью секвенирования полученной плазмидной ДНК. На основании результатов тестирования разведений приготовленного препарата СОП ПКО SARS-гес с помощью количественного теста AMPLICOR HIV MONITOR была определена концентрация исходного препарата, которая составила $1,8 \cdot 10^6$ геномных эквивалентов фага в 1 мл препарата. Этот препарат использовали в дальнейшем для оценки аналитической чувствительности тест-системы. Внутренний контрольный образец РНК представляет собой бактериофаг ms2, содержащий рекомбинантную молекулу РНК, включающую последовательность, комплементарную диагностическим праймерам. Он добавляется в каждую пробу на этапе выделения РНК и позволяет избежать ложноотрицательных результатов при неправильном проведении исследования и наличии ингибиторов ОТ или ПЦР в клинических образцах (в частности, в образцах фекалий). Использование оптимальной концентрации внутреннего контрольного образца дает возможность проводить его совместную амплификацию в одной пробирке со специфичной кДНК без снижения чувствительности анализа, а различие фрагментов ПЦР по длине не создает трудностей при их визуализации. При амплификации ВКО образуется фрагмент размером 400 п. н., в то время как размер специфичного фрагмента амплификации составляет 221 п. н. Секвенирование ДНК проводили методом "cycle sequence" с набором ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v. 1 ("Applied Biosystems", США) согласно инструкции изготовителя с использованием ABI-3100 PRISM[™] Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США).

Результаты и обсуждение

По рекомендации ВОЗ и Центра контроля и профилактики инфекционных заболеваний США основные лабораторные критерии для подтверждения диагноза ТОРС — обнаружение антител к ТОРС-ассоциированному коронавирусу методами ИФА, непрямо́й иммунофлуоресценции в образцах сыворотки крови и/или выявление РНК вируса методом ОТ-ПЦР, а также выделение ТОРС-ассо-

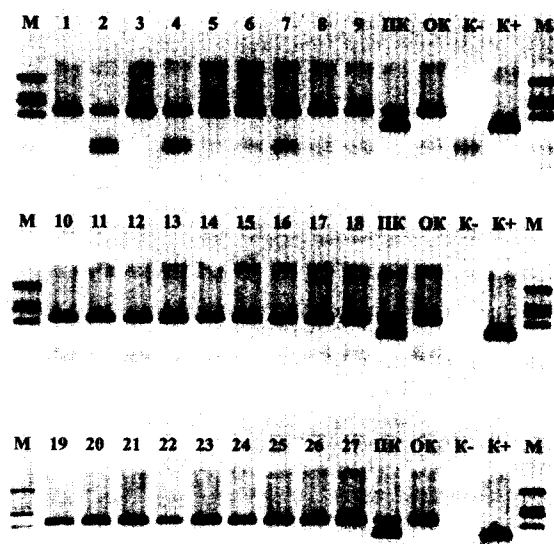


Рис. 1. Оценка специфичности тест-системы при тестировании клинического материала.

Здесь и на рис. 2—6: М — маркер размера фрагментов ПЦР, ОК — отрицательный контроль выделения РНК, ПК — положительный контроль выделения РНК, К- — отрицательный контроль ПЦР, К+ — положительный контроль ПЦР. 1—9 — мазки из ротоглотки. 10—18 — образцы плазмы крови. 19—27 — образцы фекальных экстрактов.

цированного коронавируса в культуре клеток. Однако, по данным J. Peiris и соавт., специфические антитела к вирусу ТОРС появляются в диагностическом титре только на 14—30-й день от момента появления симптомов заболевания. Поэтому серологические тесты, направленные на обнаружение антител, не могут быть использованы для ранней диагностики заболевания. Для выделения вируса ТОРС в культуре клеток требуется несколько дней, поэтому метод также непригоден для экспресс-диагностики. Таким образом, предпочтительной является молекулярная диагностика на основе выявления вирусной РНК методами ОТ-ПЦР. Учитывая отсутствие коммерчески доступных, стандартизованных тест-систем для проведения ОТ-ПЦР, мы предприняли попытку разработать отечественный диагностикум.

В качестве мишени для диагностических праймеров нами была выбрана консервативная область генома — фрагмент, кодирующий репликазу вируса. Специфичность ПЦР-анализа, проведенного с выбранными нами праймерами, исследовали на панели образцов, состоящей из штаммов и изолятов вирусов, принадлежащих к семейству Coronaviridae, но не вызывающих данного заболевания, вирусов и микроорганизмов, вызывающих острые респираторные и кишечные инфекции, клинического материала, полученного от больных ОРЗ или с ОКИ и доноров. Перечень штаммов, изолятов и клинических образцов приведен в разделе "Материалы и методы". В общей сложности было протестировано 68 штаммов и изолятов и 240 образцов клинического материала. Ложноположительные либо сомнительные результаты не были зарегистриро-

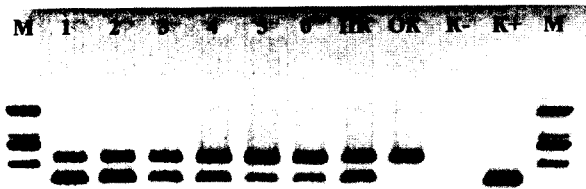


Рис. 2. Оценка аналитической чувствительности тест-системы в фекалиях.

Здесь и на рис. 3: М — 1200, 670, 550 и 345 п. н. (сверху вниз). Здесь и на рис. 3 и 4: 1 — образец, содержащий $1,8 \cdot 10^5$ гз/мл, 2 — $6 \cdot 10^4$ гз/мл, 3 — $2 \cdot 10^4$ гз/мл, 4 — $6,7 \cdot 10^3$ гз/мл, 5, 6 — $2,2 \cdot 10^3$ гз/мл. гз — геномный эквивалент.

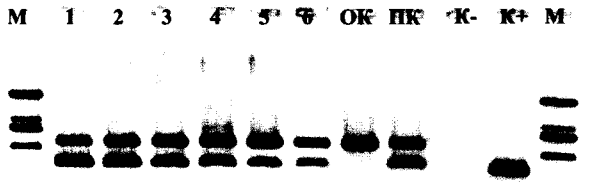


Рис. 3. Оценка аналитической чувствительности тест-системы в мазках из ротоглотки.

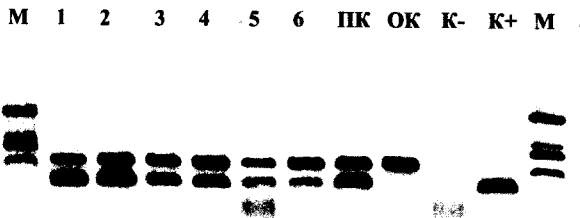
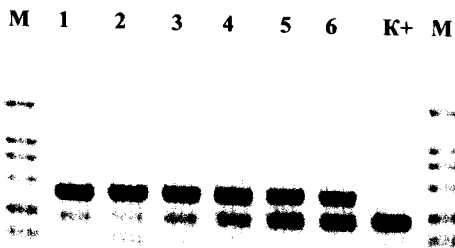


Рис. 4. Оценка аналитической чувствительности тест-системы в плазме крови.

Здесь и на рис. 5: ОК — отрицательный контроль выделения РНК, ПК — положительный контроль выделения РНК, К- — отрицательный контроль ПЦР, К+ — положительный контроль ПЦР.



ваны ни в одном случае, что свидетельствует о 100% специфичности тест-системы. На рис. 1 представлена часть результатов оценки специфичности при тестировании образцов клинического материала.

Оценка аналитической чувствительности тест-системы (включая все этапы — выделение РНК вируса, реакцию ОТ-ПЦР) проводилась как с использованием сконструированного СОП ПКО SARS-rec, так и на панели образцов, представляющих собой точки разведений ВСЖ с титром 10^7 ТЦД₅₀/мл.

Аналитическую чувствительность тест-системы на титровании СОП ПКО исследовали параллельно в трех видах клинического материала — плазме крови, мазках из ротоглотки и в осветленном экстракте фекалий. Чувствительность тест-системы во всех видах клинического материала оказалась одинаковой и составила $2,2 \cdot 10^3$ геномных эквивалентов рекомбинантной РНК в 1 мл исследуемого материала (рис. 2—4).

Результаты исследования аналитической чувствительности тест-системы, полученные при тестировании разведений ВСЖ ТОРС, представлены на рис. 5. Для проведения этого исследования были приготовлены рабочие разведения ВСЖ с концентрацией соответственно 10^4 , 10^3 , 10^2 и 10 ТЦД₅₀/мл питательной среды, которые тестировались в параллелях. Работу с ВСЖ проводили в соответствии с правилами работы с вирусами 2-й группы патогенности в помещениях специально оборудованной лаборатории 2-го уровня биологической безопасности в Пекинском институте микробиологии и эпидемиологии (ПИМЭ). Результаты показывают, что разработанная тест-система "АмплиСенс SARS" позволяет выявлять вирус ТОРС в титре 10 ТЦД₅₀/мл.

По мнению специалистов ВОЗ, отрицательные результаты лабораторных исследований на данный момент не могут служить доказательством того, что пациент не инфицирован вирусом ТОРС, так как с одной стороны, до сих пор нет зарегистрированных тест-систем для диагностики ТОРС, а с другой стороны, накоплено мало данных относительно того, какой клинический материал является наиболее информативным и в какие сроки он должен быть собран. На настоящий момент опубликовано единственное масштабное исследование J. Peiris и соавт., которые обследовали 75 пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС. Согласно этим данным, появление специфических к вирусу ТОРС антител класса IgG в диагностическом титре наблю-

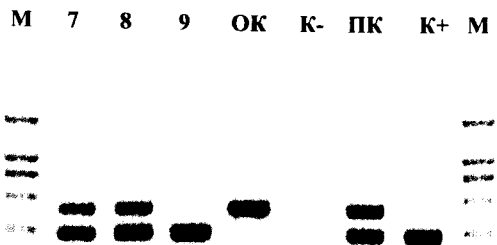


Рис. 5. Оценка предела чувствительности тест-системы при тестировании разведений ВСЖ. 1, 2 — разведение ВСЖ 10 ТЦД₅₀/мл, 3, 4 — 10^2 ТЦД₅₀/мл, 5, 6 — 10^3 ТЦД₅₀/мл, 7, 8 — 10^4 ТЦД₅₀/мл, 9 — 10^5 ТЦД₅₀/мл.

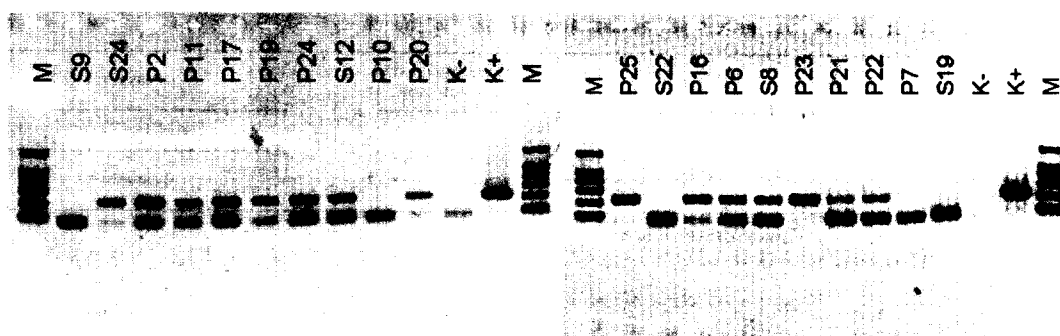


Рис. 6. Результаты тестирования клинического материала из ПИМЭ (КНР).

K- — отрицательный контроль ПЦР, K+ — положительный контроль ПЦР. Образцы, в которых обнаружена РНК SARS-Cov: S24, P2, P11, P17, P19, P24, S12, P20, P25, P16, P6, S8, P23, P21, P22. Образцы, в которых РНК вируса ТОРС не обнаружена: S9, P10, S22, P7, S19.

далось у 70 (93%) пациентов в среднем к 20-му дню от момента появления симптомов заболевания. При тестировании назо-фарингеальных смывов методом ПЦР вирус был обнаружен у 24 (32%) из 75 пациентов на момент поступления в стационар (в среднем на $3,2 \pm 1,3$ день после появления симптомов заболевания) и у 51 (68%) при взятии материала на 14-й день. У 14 пациентов проводилось измерение "вирусной нагрузки" методом количественной ОТ-ПЦР в назо-фарингеальных смывах. При этом пик "вирусной нагрузки" был зарегистрирован на 10-й день после появления симптомов заболевания — $1,9 \cdot 10^7$ копий/мл, а к 15-му дню наблюдалось ее падение до $9,8 \cdot 10^4$ копий/мл, т. е. ниже величин, зарегистрированных при поступлении в стационар ($2,3 \cdot 10^5$ копий/мл). При тестировании образцов мочи РНК ТОРС была выявлена в 31 (42%) из 74 образцов, собранных в среднем на 15-й день от момента появления симптомов заболевания. При тестировании фекалий, собранных позднее — на $14,2 \pm 2,2$ день после появления симптомов заболевания, методом ОТ-ПЦР вирус был обнаружен у 65 (97%) из 67 пациентов. У 55 (73%) из 75 пациентов в среднем на 7-й день было зарегистрировано начало водянистой диареи, но к моменту сбора фекалий, симптом практически у всех уже отсутствовал.

Имеющиеся на сегодняшний день данные по изучению коронавируса показывают, что коронавирусы одинаково хорошо реплицируются в респираторном и кишечном тракте [9]. Например, коронавирус, вызывающий энтерит телят, размножается как в эпителии респираторного тракта, так и в эпителиальных клетках кишечника, но вызывает только диарею, без проявления респираторных симптомов. Для вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней характерны пероральный и аэрогенный путь проникновения вируса, при этом при аэрогенном проникновении он может реплицироваться в альвеолярных макрофагах и клетках Купфера. На основании этого можно предположить, что для молекулярной диагностики ТОРС наиболее информативным клиническим материалом могут быть фекалии. Приемлем также материал из верхних дыхательных путей — слюна, мазки и смывы из носо- и ротоглотки. Данных по тестированию РНК вируса ТОРС в плазме или сыворотке крови пока недостаточно.

Проведенные нами испытания тест-системы "Амплиценс-SARS" на клиническом материале, полученном от пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС, подтверждают это предположение. Исследования проводились на базе ПИМЭ в лаборатории 3-го уровня биологической безопасности. В работе использовали РНК, полученную из клинического материала (мокрота и фекалии) от 22 пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС, из них у 21 человека определяли специфические к вирусу ТОРС антитела методом ИФА (Китай). Все образцы параллельно тестировались с использованием двух методик ПЦР, разработанных в ЦНИИЭ и в ПИМЭ. Описание пациентов, образцов клинического материала и результаты исследований отражены в таблице и на рис. 6. Проведенное исследование показало, что метод ПЦР, разработанный в ЦНИИЭ, позволил выявить вирус ТОРС у 19 (86,4%) из 22 пациентов, т. е. с большей чувствительностью, чем метод ПЦР, разработанный в ПИМЭ [14 (63,6%) из 22 пациентов]. При этом вирус чаще выявлялся в образцах фекалий [в 18 (81,8%) из 22], чем в мокроте [в 8 (36,4%) из 22], и практически у всех пациентов, кроме одного, при наличии вируса в мокроте он также присутствовал в фекалиях. Специфические антитела к вирусу ТОРС были выявлены у 16 (76,2%) из 21 пациента.

У 2 пациентов (№ 3 и № 10) результат иммунологического анализа на наличие антител к вирусу ТОРС был отрицательным, при этом обе тест-системы также не выявили вируса ни в фекалиях, ни в мокроте. На основании этих результатов можно предположить, что диагноз ТОРС им был поставлен ошибочно. Если этих пациентов исключить из выборки, то получаются следующие результаты: чувствительность ИФА составила 84,2% (16 из 19 образцов), чувствительность ПЦР тест-системы ЦНИИЭ в целом — 95% (19 из 20 образцов), в фекалиях — 90% (18 из 20 образцов) и в мокроте — 40% (8 из 20 образцов). Таким образом, наиболее информативным для диагностики клиническим материалом являются фекалии, даже при отсутствии симптома диареи, который был зарегистрирован только у 1 пациента.

У пациента № 7 были выявлены антитела к вирусу ТОРС, но обе ПЦР тест-системы не обнаружили РНК вируса ни в его мокроте, ни в фекалиях. Однако при постановке анализа не использовался

Клинические данные и результаты тестирования образцов из ПИМЭ (КНР)

Код пациента	Симптомы			Время взятия материала от начала симптомов, дни		Результат ИФА	Результат ПЦР				
	дня- рея	респираторные		поражение легочной ткани	мокрота		фекалии	ПИМЭ		ЦНИИЭ	
		продуктивный кашель	непродуктивный кашель					мокрота	фекалии	мокрота	фекалии
S1/P1	-	-	-	Присутствует у всех	35	35	+	-	-	-	+
S2/P2	-	-	+		33	33	+	-	+	-	+
S3/P3	-	-	+		22	22	-	-	-	-	-
S6/P6	-	-	н. д.		37	37	+	-	Сомнительный	-	+
S7/P7	-	-	н. д.		17	17	+	-	Сомнительный	-	-
S8/P11	-	-	-		30	30	+	+	-	+	+
S9/P9	-	-	-		35	35	+	-	-	-	+
S10/P10	-	-	+		34	34	-	-	-	-	-
S11/P8	-	-	-		45	45	+	-	-	+	-
S12/P12	-	-	н. д.		20	20	+	-	-	+	+
S14/P14	-	-	-		26	26	+	-	+	-	+
S15/P15	-	-	-		27	27	+	+	+	+	+
S16/P16	-	-	+		12	12	-	+	+	+	+
P17/S17	-	-	-		32	32	-	-	+	+	+
S19/P19	-	-	-		33	33	+	+	-	-	+
S20/P20	-	-	-		25	25	+	-	+	+	+
S21/P21	-	-	+		15	15	-	-	+	-	+
S22/P22	-	-	+		37	37	+	-	+	-	+
P23/S23	-	-	-		24	24	+	-	+	-	+
S24/P24	-	н. д.	н. д.		н. д.	н. д.	+	-	+	+	+
S5/P5	+	-	-		65	65	+	-	+	-	+
S25/P25	-	-	н. д.		65	65	н. д.	-	+	-	+
Всего...							76,2%	18,2%	54,5%	36,4%	81,8%
								63,6%		86,4%	

Примечание. Плюс — да, минус — нет, н. д. — нет данных.

внутренний контрольный образец, позволяющий контролировать наличие в пробах ингибиторов ОТ-ПЦР, и поэтому нельзя исключить, что на этих пробах могли быть получены ложно отрицательные результаты ПЦР-анализа, обусловленные наличием ингибиторов реакции. В таком случае исследование нужно было бы повторить с момента выделения РНК.

Таким образом, нами была разработана первая отечественная тест-система для диагностики ТОРС методом ПЦР. В процессе испытаний установлено, что тест-система позволяет выявлять вирус ТОРС в титре 10^3 ТЦД₅₀/мл ВСЖ, а при работе с рекомбинантной РНК ПКТО ТОРС аналитическая чувствительность тест-системы во всех рекомендованных видах клинического материала составила $2,2 \cdot 10^3$ геномных эквивалентов в 1 мл исследуемого материала. Испытания на клиническом материале от пациентов с предполагаемым диагнозом ТОРС, проведенные в КНР, показали, что диагностическая чувствительность тест-системы "АмплиСенСАРС" составила 95%. При этом вирус выявляется преимущественно в образцах фекалий (90%) и гораздо реже в мокроте (40%), что позволяет рекомендовать обязательное проведение тестирования фекалий в схеме лабораторного анализа на ТОРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee N., Hui D. S., Wu A. et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N. Engl. J. Med. 2003; 348: 1984—1994.

- Poutanen S. M., Low D. E., Henry B. et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. N. Engl. J. Med. 2003; 348 (20): 1995—2005.
- Hsu L. Y., Lee C. C., Green J. A. et al. Severe acute respiratory syndrome in Singapore: clinical features of index patient and initial contacts. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9 (6): 713—717.
- Marra M. A., Jones S. J. M., Astell C. R. et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science 2003; 300: 1399—1404.
- Uo L. K., Godeke G. J., Raamsman M. J. B. et al. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: Crossing the host cell species barrier. J. Virol. 2000; 74 (3): 1393—1406.
- Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses / van Regenmortel M. H. V. et al. New York: Academic Press; 2000.
- Rota P. A., Oberste M. S., Monroe S. S. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science 2003; 300: 1394—1399.
- Poland A. M., Vennema H., Foley J. E. et al. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. J. Clin. Microbiol. 1996; 34 (2): 3180—3184.
- Peiris J. S. M., Chu C. M., Cheng V. C. C. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet 2003; 361: 1767—1772.
- Worobey M., Holmes E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. J. Gen. Virol. 1999; 80: 2535—2543.
- Banner L. R., Lai M. M. Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. Virology 1991; 185 (1): 441—445.
- Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 495—503.