

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА

*Н. М. Дрефс, В. А. Антонов, И. А. Баркова, Е. А. Снатенков,
Т. В. Булатова, Н. П. Храпова, В. П. Смелянский*

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,
Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра молекулярной биологии и генетики*

Целью работы являлась оценка информативности результатов твердофазного иммуноферментного метода, полученных с помощью экспериментальных и коммерческих тест-систем, имеющихся на современном рынке, предназначенных для выявления иммуноглобулинов к возбудителю лихорадки Западного Нила. Для получения точного лабораторного диагноза в первые дни после инфицирования предпочтительно использование двух вариантов тест-систем: «Anti-West Nile virus ELISA (IgM)» + «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия). В более поздние сроки заболевания мы рекомендуем проведение иммуноферментного анализа с помощью тест-систем: «Anti-West Nile virus ELISA (IgG)» + «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия).

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, IgG, IgM, твердофазный иммуноферментный метод.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF TEST KITS DESIGNED TO DETECT IMMUNOGLOBULINS TO THE WEST NILE FEVER AGENT

*N. M. Drefs, V. A. Antonov, I. A. Barkova, E. A. Snatenkov,
T. V. Bulatova, N. P. Khrapova, V. P. Smelyansky*

The aim of this work was to evaluate the informativeness of the results of ELISA obtained by experimental and commercial test kits designed to detect immunoglobulins to the West Nile fever agent. To obtain an accurate laboratory diagnosis in the first days after infection two variants of test kits «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)»+«Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Germany) should be used preferably. In the last stages of disease and after the transferred infection we recommend setting of ELISA using the complex of following immunoenzyme kits: «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)»+«Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Germany).

Key words: West Nile Virus, IgM, IgG, enzyme-linked immunosorbent assay.

За период с 1997 г. по 2010 г. в Российской Федерации лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) заболело 1500 человек, из них в Волгоградской области — 940 человек (62,6 %) и 380 (25,3 %) — в Астраханской [2, 3]. Впервые крупная вспышка ЛЗН зарегистрирована в 1999 г. в Волгоградской и Астраханской областях с числом заболевших 475 и летальностью 9 %. Лабораторно диагноз ЛЗН был подтвержден у 380 (Волгоградская область) и 95 больных (Астраханская область) [1].

В связи с необходимостью постоянного эпидемиологического надзора на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института в соответствии с приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 г. был организован Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН.

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) вирус ЛЗН возможно обнаружить в спинномозговой жидкости или в крови лишь в начальные сроки заболевания, тогда как специфические антитела определяются и в более поздние сроки. Таким образом, тактика по лабораторной диагностике ЛЗН, осуществляемая сотрудниками центра, включала параллельное исследование крови и спинномозговой жидкости методом ПЦР и твердофазным иммуноферментным методом (ТИФМ).

Специфические IgM с помощью ТИФМ определяют в сыворотке крови уже на третий день после появления первых симптомов заболевания. Антитела класса G можно обнаружить в сыворотке крови с 7—10 дня от момента инфицирования [6]. Специфические IgG имеют значение для подтверждения правильного диагноза на разных этапах заболевания, а также для ретроспективной диагностики. Тесты по определению авидности специфических IgG предложены производителями для разграничения стадий ЛЗН: низкоавидные IgG свидетельствуют о первичной или острой инфекции, высокоавидные — о перенесенном заболевании [4, 7].

По данным Вашингтонского национального исследовательского Центра Департамента сравнительной медицины, в настоящее время в Америке и Канаде для диагностики ЛЗН используются 6 коммерческих иммуноферментных тест-систем американских производителей «PanBio» («PanBio IgM ELISA», «PanBio IgG ELISA»), «InBios» («InBios IgG ELISA», «InBios IgM ELISA») и «Focus» («FocusDiagnostics IgG ELISA», «FocusDiagnostics IgM ELISA») [3]. В европейских диагностических лабораториях наряду с американскими иммуноферментными наборами

ми востребованы тест-системы для обнаружения антител к вирусу ЛЗН от производителей «EuroimmunAG» (Германия) [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить информативность результатов ТИФМ, полученных с помощью экспериментальных и коммерческих тест-систем, имеющих на современном рынке, предназначенных для выявления иммуноглобулинов к возбудителю ЛЗН.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись сыворотки крови от 52 лиц с подозрением на ЛЗН. Обследуемые были инфицированы в летне-осенний сезон 2011 г. Образцы сывороток крови разделили на 2 группы: 28 образцов сывороток крови из Волгоградской области — I группа и 24 из Астраханской области — II группа.

Для исследования сывороток крови ТИФМ применяли тест-системы «Векто-НИЛ-IgG», «ВектоНИЛ-IgG-авидность» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)», «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)», «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия) и «3H-IgM» («Биосервис», г. Боровск).

С помощью тест-систем «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)», «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» и «3H-IgM» выполняли скрининговый анализ образцов сывороток крови. Посредством тест-системы «Векто-НИЛ-IgG» определяли титр антител в развернутой реакции.

Расчет % индекса авидности (ИА) IgG осуществляли на основании тест-систем «ВектоНИЛ-IgG-авидность» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) и «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При постановке ТИФМ с помощью тест-системы «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» как в I, так и во II группах ряд образцов сывороток крови имели положительный индекс «отношение (RATIO)» (отношение оптической плотности образца к оптической плотности калибратора) (табл.). Использование планшетов «3H-IgM» от производителя «Биосервис», (г. Боровск) дало 100% положительный результат. При последующем тестировании биологического материала, осуществляемого посредством тест-системы «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)», выяснено, что антитела IgG были обнаружены в пробах сывороток крови обеих групп (табл.). При параллельном исследовании всех образцов сывороток крови на наличие специфических IgG с помощью тест-системы «Векто-НИЛ-IgG» количество положительных результатов оказалось значительно выше. В I группе положительных результатов было в 2 раза больше, а во II группе — в 3 (табл.).

Сравнение положительных результатов ТИФМ, полученных с помощью различных тест-систем, абс./%

| Образцы сывороток крови | Тест-система «3H-IgM» | Тест-система «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» | Тест-система «Векто-НИЛ-IgG» | Тест-система «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» |
|-------------------------|-----------------------|---|------------------------------|---|
| I группа (n = 28) | 28 / 100 | 16 / 57,1 | 24 / 85,7 | 12 / 42,8 |
| II группа (n = 24) | 24 / 100 | 2 / 8,3 | 15 / 62,5 | 5 / 20,8 |

Наряду с оценкой результатов ТИФМ, осуществляемого различными тест-системами, был произведен сравнительный анализ их технических характеристик. Наиболее корректным является сравнение результатов ТИФМ, воспроизведенного на иммуноферментных планшетах от одного производителя и, как следствие, анализируемого по единой системе оценки результатов. Так как производитель «Euroimmun AG» предоставил иммунологические наборы на выявление антител класса IgG к вирусу ЛЗН, антител класса IgM к вирусу ЛЗН и на определение авидности специфических IgG, то выбор данных тест-систем при сравнительном анализе результатов являлся приоритетным. Кроме того, данные тест-системы обладали рядом неоспоримых преимуществ: время, затрачиваемое на постановку ТИФМ минимальное (в среднем около 2 ч), реагенты в наборе уже готовы к использованию, что уменьшает трудоемкость процесса. Тест-системы компании «Euroimmun AG», предназначенные для диагностики ЛЗН, приказом Росздравнадзора от 30.06.2010 г. разрешены для применения на территории РФ (Регистрационное удостоверение ФСЗ № 2010/-7294).

Исследование сывороток крови от лиц, инфицированных вирусом ЛЗН, с помощью тест-системы «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» и «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» показало, что индекс «отношение (RATIO)» как для IgG, так и для IgM в ряде случаев попадал в интервал от $\geq 0,8$ до $< 1,1$ (то есть пограничные результаты). Согласно инструкции, прилагаемой к набору для постановки ТИФМ «Anti-West Nile Virus ELISA», при выявлении пограничных результатов требуется повторить реакцию. Проведя параллельный анализ сывороток крови от этих же лиц на присутствие IgG посредством тест-системы «Векто-НИЛ-IgG», мы выяснили, что во всех пробах зарегистрированы титры антител IgG в диапазоне от 1:400 до 1:6400.

Подавляющее большинство образцов сывороток крови в обеих группах имели высокоавидные антитела ИА (>60 % при использовании тест-системы «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» и >70 % для «Векто-НИЛ-IgG»), что свидетельствовало о разгаре заболевания или о перенесенной инфекции. Часть образцов сывороток крови имела ИА, попадающий в категорию «неопределенный результат» (от 40 до 60 % для «Avidity Anti-West

Nile Virus (IgG) ELISA») или в «серую зону» (от 50 до 70 % для «Векто-НИЛ-IgG).

Во II группе больных методом ПЦР РНК вируса Западного Нила (ВЗН) не получено ни одного положительного результата, в то время как в первой группе (Волгоградская область) РНК ВЗН выявлена в 6 случаях из 28 анализируемых проб (рис.). Не исключено, что низкий процент выявления РНК ВЗН связан с тем, что для данного заболевания характерен низкий уровень вирусемии и непродолжительный период циркуляции вируса в крови (рис.).

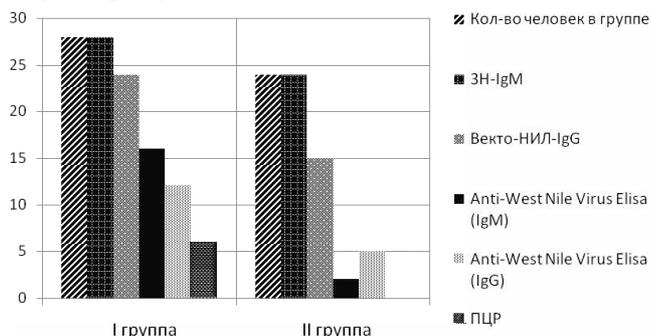


Рис. Сравнение положительных результатов ТИФМ и ПЦР

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ представленных данных показал, что для точной лабораторной диагностики в первые дни после инфицирования возможно использование двух вариантов тест-систем: «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» + «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA». Тест-систему «3H-IgM» («Биосервис», г. Боровск) целесообразно использовать лишь при скрининге антител класса IgM у подозрительных на ЛЗН лихорадящих больных.

В более поздние сроки заболевания и после перенесенной инфекции мы рекомендуем постановку ТИФМ с помощью комплекса следующих иммуноферментных наборов: «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» + «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA». При получении пограничных значений в ИФА, осуществляемым посредством тест-системы «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» или одновременной регистрации пограничных

результатов в тест-системах «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» и «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)», требуется повторная постановка реакции в парных сыворотках, а сочетанное использование вышеназванных иммуноферментных наборов с тест-системой «Векто-НИЛ-IgG» даст более полное представление о стадии заболевания ЛЗН и исключит результаты, попадающие в разряд «неопределенные результаты» или «серая зона». Следует дополнительно отметить, что лабораторная диагностика инфекционных заболеваний проводится на основе зарегистрированных тест-систем в Российской Федерации, к которым относятся наборы «Euroimmun AG» (Германия). Отечественные тест-системы, несмотря на высокую специфичность и чувствительность, можно будет рекомендовать к использованию в лабораторной практике лишь после регистрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д. К., Писарев В. Б., Петров В. А. и др. Лихорадка Западного Нила по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999—2002 гг. — Волгоград, 2004. — 102 с.
2. Мананков В. В., Алексеев В. В., Смелянский В. П. и др. // Вестник ВолгГМУ. — 2011. — № 4. — С. 45—49.
3. Путинцева Е. В., Смелянский В. П., Антонов В. А. и др. // Пробл. особо опасных инф. — 2010. — № 104. — С. 14—17.
4. Hukkanen R. R., Liggitt H. D., Kelley S. T., et al. // Comp. Med. — 2006. — Vol. 56, № 1. — P. 46—54.
5. Matheus S., Deparis X., Labeau B., et al. // J. Clin. Microbiol. — 2005. — Vol. 43, № 6. — P. 2793—2797.
6. Niedrig M., Donoso Mantke O., Altmann D., et al. // J. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 7, №72. — P. 1852—1854.
7. Rohering J. T., Nash D., Maldin B., et al. // J. Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9, № 3. — P. 376—379.
8. Souza V. A., Fernandis S., Araujo E. S., et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, № 4. — P. 1782—1784.

Контактная информация

Дрефс Наталья Михайловна — к. б. н., ст. науч. сотр. лаб. иммунодиагностики и биотехнологии ВолгоградНИПЧИ, ассистент кафедры молекулярной биологии и генетики ВолгГМУ, e-mail: drefsnt@mail.ru