

На правах рукописи

АКИНШИНА

Юлия Александровна

**РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ**

03.02.02. – вирусология

14.03.10. – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

Научные руководители:

Ларичев Виктор Филиппович - доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Марданлы Сейфаддин Гашим оглы - доктор медицинских наук, президент и директор по науке ЗАО «ЭКОлаб», профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет».

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович - доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Эмануэль Владимир Леонидович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ, директор НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине на базе ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 года в __ - __ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.130.03 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра www.gamaleya.org

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Бурцева Елена Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Глобализация мирового сообщества, начавшаяся во второй половине XX в., интенсификация миграционных потоков - способствовали изменению эпидемиологии многих инфекционных заболеваний. Так, в конце прошлого века получила повсеместное распространение лихорадка денге (ЛД) [Wan S.W. et al., 2013]. С каждым годом увеличивается количество зарегистрированных завозных случаев этого заболевания из стран тропического и субтропического поясов на неэндемичные территории, в том числе и Российской Федерации.

В соответствии с требованиями СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации», лихорадка денге включена в перечень заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране на всей территории России. В Москве и Московской области соответствующие требования введены приказом Департамента здравоохранения г. Москвы от 19.09.2017 г. № 675. С 2012 г. в Российской Федерации ведется обязательная регистрация случаев лихорадки денге.

За 2009-2015 гг. сотрудниками ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения г. Москвы» и ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России было выявлено 184 лабораторно подтвержденных случая этой инфекции (в том числе и ряд случаев геморрагической лихорадки денге) среди лиц, госпитализированных после возвращения из поездок в страны, эндемичные для ЛД.

Ввиду полиморфизма клинической симптоматики этиологический диагноз этого заболевания часто затруднителен без лабораторного подтверждения, однако существует проблема обеспечения клинических лабораторий необходимыми отечественными средствами диагностики, в число которых входят иммуноферментные тест-системы для выявления антител классов М и G. В Российской Федерации на сегодняшний день разрешены к обращению тест-системы исключительно зарубежных производителей. Целесообразность разработки и внедрения в практику отечественных тест-систем, не уступающих по своей эффективности импортным очевидна и актуальна.

Степень разработанности темы исследования

В зарубежных литературных источниках вопросы серологической диагностики лихорадки денге, применения тест-систем на разных стадиях заболевания, определения типа вируса возбудителя ЛД, изучения прогнозирования развития геморрагического синдрома денге освещаются не в полной мере и основаны на сравнительном применении тест-систем различных производителей

на ограниченном количестве сывороток от больных ЛД. В настоящей работе научно обоснованы результаты обследования больных и показана диагностическая ценность ИФА тест-систем для серологической диагностики ЛД, что позволит впоследствии наиболее эффективно их использовать при верификации завозных случаев инфекции.

Цель исследования:

Разработка ИФА тест-систем для серологической диагностики лихорадки денге, их характеристика, апробация на клиническом материале с целью совершенствования качества диагностики лихорадки денге.

Задачи исследования

1. Разработать ИФА наборы реагентов для серологической диагностики лихорадки денге: четыре моновалентные тест-системы (MAC-ELISA) для выявления антител класса М к каждому из четырёх типов вирусов денге и две поливалентные тест-системы для выявления группоспецифических IgG и IgM.
2. Определить эффективность применения разработанной тест-системы для выявления М антител к вирусу денге в сыворотке крови больных.
3. Изучить эффективность метода ИФА-IgM (MAC-ELISA) для типовой идентификации вируса денге, вызвавших конкретные случаи лихорадки денге.
4. Изучить эффективность ИФА-IgG тест-системы для дифференциальной диагностики лихорадки денге.
5. Определить область применения тест-системы для выявления G антител к вирусу денге в сыворотках крови больных.

Научная новизна

Впервые в разработаны и апробированы отечественные поливалентные иммуноферментные тест-системы для обнаружения антител класса М и G к вирусу денге, а также четыре моновалентные тест-системы, предназначенные для обнаружения типоспецифических антител М, что позволяет верифицировать один из четырех типов вируса денге, вызвавшего заболевание.

Проведенное исследование позволило расширить алгоритм лабораторного обследования при этиологической диагностике лихорадочных состояний. Начиная с 5 дня заболевания показано обследование сыворотки в иммуноферментных IgM тест-системах для идентификации патогена среди близкородственных флавивирусов. Показано, что определение IgG в ранние сроки развития заболевания не позволяет прогнозировать развитие геморрагического синдрома у больных лихорадкой денге.

Теоретическая и практическая значимость работы

По результатам диссертационного исследования и анализа полученных сведений определена область применения иммуноферментного анализа для серологической диагностики лихорадки денге. Определены критерии учета результатов ИФА для выявления IgM и IgG к вирусу денге при серологической диагностике лихорадки денге. Полученные результаты дополняют современные представления зарубежных авторов об эффективности методов диагностики ЛД, природы возникновения геморрагического синдрома и дают возможность дальнейшего изучения этого заболевания.

Анализ данных, описанный в настоящей работе, позволяет повысить эффективность работы по специфической диагностике ЛД, а также дифференциальной диагностики с другими лихорадочными заболеваниями, выполняемой практическими лабораториями. Доказано значение вирусов денге в этиологии случаев заболеваний у пациентов, вернувшихся из эндемичных регионов, и установлены сроки эффективного серологического обследования больных лихорадкой денге, которые должны быть использованы для правильной постановки диагноза и прогнозирования ГЛД. Эти данные включены в курс лекций по микробиологии для студентов фармацевтического факультета на кафедре фармакологии и фармацевтических дисциплин Государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО ГГТУ).

В соответствии с результатами диссертации разработан и подготовлен пакет документов для реализации стандартных операционных процедур предприятия ЗАО «ЭКОлаб» (СОП-251), на основании которых созданы экспериментальные серии наборов «ИФА-IgM-полиденге», «ИФА-IgG-полиденге», «ИФА-IgM-денге1», «ИФА-IgM-денге2», «ИФА-IgM-денге3», «ИФА-IgM-денге4». Наборы используются для исследовательских целей.

Результаты проведенных исследований легли в основу разработанного нормативно регламентирующего документа: Методические рекомендации МР 4.2.0108-16 «Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадки денге»[12] и учебно-методического пособия «Новые и возвращающиеся вирусные инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации». С учётом выполненных в работе исследований с применением поливалентной ИФА-IgM тест-системы был разработан «набор реагентов для дифференциального определения IgM антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа». РУ от 26.11.2018 г. № РЗН 2018/7810.

Положения, выносимые за защиту

1. Впервые в разработаны шесть видов оригинальных иммуноферментных наборов реагентов для серологической диагностики лихорадки денге: четыре моновалентных ИФА-IgM (MAC-ELISA) для выявления специфических антител класса М к каждому из четырёх вирусов денге и два поливалентных для выявления группоспецифических IgG и IgM в сыворотке крови человека.
2. Установлена 100% диагностическая эффективность тест-системы «ИФА-IgM-денге» для верификации клинического диагноза лихорадки денге у больных с 5 дня болезни.
3. Метод ИФА-IgM (MAC-ELISA) с разработанными наборами реагентов позволяет осуществлять дифференциальную диагностику лихорадки денге от других флавивирусных инфекций, однако наличие перекрестных серологических реакций в 4,2 % случаев обязывает проводить верификацию этиологического агента путем сравнительного анализа титров антител в гетерогенных тест-системах.
4. Исследование сывороток крови от больных лихорадкой денге с использованием моновалентного варианта метода ИФА-IgM (MAC-ELISA) позволяет дифференцировать типы вируса денге, вызвавшего заболевание, в 37,1% случаев.
5. Применение ИФА тест-систем для выявления антител класса G к вирусам денге, клещевого энцефалита и Западного Нила, как правило, не позволяет дифференцировать эти инфекции, но может использоваться для серо-эпидемиологических исследований и как дополнительный подтверждающий тест.

Степень достоверности результатов исследований

Степень достоверности диссертационного исследования определяется значительным числом исследуемых образцов от больных, вернувшихся из эндемичных стран мира. Иммуноферментный анализ проводился с использованием сертифицированного оборудования и современных программ для обработки полученных результатов ИФА: MS Excell и IBM SPSS Statistics. Проведение диссертационного исследования было одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (протокол заседания от 26.05.2016г.). Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (протокол №1 от 26 мая 2016г.). Апробация диссертации состоялась 25.12.2019г. на заседании Совета по предварительной экспертизе диссертационных работ ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» по проблеме «Общая вирусология и инфекционные болезни» и рекомендована к публичной защите.

Внедрение результатов исследований в практику

Результаты диссертационного исследования находят применение в работе лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России для верификации завозных случаев ЛД у пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ».

Полученные результаты легли в основу разработанного нормативно регламентирующего документа: Методические рекомендации МР 4.2.0108-16 "Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадки денге" и учебно-методического пособия "Новые и возвращающиеся вирусные инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации".

С учётом выполненных в работе исследований с применением поливалентной ИФА-IgM тест-системы был разработан и зарегистрирован набор реагентов для дифференциального определения IgM антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа, РУ от 26.11.2018 г. № РЗН 2018/7810.

Методология и методы исследования

Объект исследования – 135 пациентов с диагнозом лихорадка денге, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в период с января 2009 по март 2014 года. Методология проведенных исследований основывается на принципах, описанных в публикациях ВОЗ и методических рекомендациях. Были использованы следующие методы: анализ клинико-эпидемиологических данных пациентов, вирусологические методы выделения вирусов из мозга новорожденных белых мышей; классические серологические реакции – РТГА, ИФА.

Апробация работы

Результаты работы были изложены на следующих конференциях и заседаниях:

- IV ежегодная Всероссийская конференция по инфекционным болезням. Москва, 26-28 марта 2012г.
- X научно-практическая конференция «Инфекционные болезни и антимикробные средства», Москва, 2-3 октября 2012г.
- Конференция Проблемной комиссии РАМН «Арбовирусы и другие вирусы зоонозов», 16 марта 2014 г. «Актуальные вопросы изучения лихорадки Западного Нила и лихорадки денге в Российской Федерации», «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России;
- XIX Всероссийская научно-практическая конференция — консолидация науки и практики в лабораторной медицине. Москва, 25–27 марта 2014г.;

- Межведомственная конференция «Эндемичные и завозные арбовирусные инфекции в Российской Федерации», 24-25 ноября 2015 г. Подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России;
- Заседание Ученого совета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 26 мая 2016 г.;
- Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». Электрогорск, 30 ноября 2017г.;
- XXIII Всероссийская научно-практическая конференция «Традиции и новации клинической лабораторной диагностики». Москва, 20-22 марта 2018г.
- VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». Электрогорск, 29 ноября 2019 г.
- Заседание Отдела арбовирусов Подразделение «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 18 декабря 2019 г.;
- Заседание апробационного совета Подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 25 декабря 2019 г., протокол № 42.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют п. 7, п. 9 и п. 10 паспорта специальности 03.02.02 – «вирусология»; п. 1, п. 2, п. 4, п. 7 и п. 8 паспорта специальности 14.03.10 – «клиническая лабораторная диагностика».

Публикации

Результаты диссертационного исследования изложены в отечественных и зарубежных печатных изданиях, в том числе, в 8 статьях в рецензируемых журналах, входящих в перечень, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации результатов диссертации.

Личный вклад соискателя

Соискатель диссертации лично определял пути решения задач и целей исследования, составлял базу участвующих в исследованиях сывороток от больных лихорадкой денге, вирусом клещевого энцефалита, Западного Нила, планировал все этапы обследования этого клинического материала, проводил иммуноферментный анализ и анализировал полученные результаты, проводил учет и интерпретацию результатов, а также их обобщение и формулировку выводов.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает 110 страниц машинописного текста и состоит из введения, 2 частей (обзор литературы и собственные исследования), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, содержащего 16 отечественных и 155 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами, 12 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология проведенных исследований основывается на принципах, описанных в публикациях ВОЗ и методических рекомендациях Роспотребнадзора. Были использованы следующие методы: клинико-эпидемиологические данные пациентов, вирусологические методы выделения вирусов из мозга новорожденных белых мышей; классические серологические реакции – РТГА, ИФА.

Все работы с вирусосодержащими и потенциально-опасными материалами проводились в лаборатории, имеющей разрешение на работу с БПА I-II групп патогенности.

Использованные вирусы и штаммы

В работе использовали следующие штаммы вирусов денге из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России (табл. 1):

Таблица 1 - Использованные в работе штаммы вирусов денге, ЗН, КЭ

Вирусы	Штамм / № регистрации в Гос. коллекции вирусов НИИ вирусологии ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России
Денге-1	I – Hawaii / ГКВ №81/2
Денге-2	Ngc
Денге-3	H-87 / ГКВ №533/2
Денге-4	H-24
Западного Нила	Аст.986 / ГКВ №994
Клещевого энцефалита	4072 / ГКВ №633/2

Лабораторные животные

В работе были использованы беспородные белые мыши-сосунки (для получения вирусного антигена) и взрослые беспородные белые мыши-самки массой 20-22 г (для получения иммунной асцитной жидкости).

Сыворотки крови больных ЛД, КЭ, ЛЗН, краснухой, ВПГ, ЦМВ, ВЭБ

В работе исследовано 135 образцов сыворотки крови от больных с диагнозом ЛД, полученных из ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ»; 24 сыворотки крови от больных КЭ, полученных из ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области"; 24 сыворотки крови от больных ЛЗН, полученных из вирусологических лабораторий ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области"; 43 сыворотки крови больных, содержащих IgM к цитомегаловирусу (ЦМВ), 6

сывороток крови, содержащих IgM к вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ), 2 сыворотки крови, содержащих IgM к вирусу простого герпеса (ВПГ) и 2 сыворотки крови, содержащих IgM к вирусу краснухи, предоставленных сотрудниками ЗАО "ЭКОлаб" г. Электрогорск.

Наборы реагентов, использованные для исследования сывороток-контролей специфичности экспериментальных тест-систем

- Набор реагентов "ИФА-Краснуха-IgM", тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к вирусу краснухи, производства ЗАО "ЭКОлаб" № ФСР 2012/13239 от 20.03.2012.
- Набор реагентов "ИФА-ЦМВ-IgM", тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к ЦМВ, производства ЗАО "ЭКОлаб" № ФСР 2007/01444 от 17.12.2007.
- Набор реагентов "ИФА-ВПГ 1+2-IgM", тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к ВПГ I и II типа, производства ЗАО "ЭКОлаб" № ФСР 2007/01443 от 17.12.2007.
- Набор реагентов "ВектоВЭБ-VCA-IgM" - тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к капсидному антигену VCA ВЭБ в сыворотке (плазме) крови, производства ЗАО "Вектор – Бест" РУ № РЗН 2013/1279.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение вирусных антигенов

Антигены вирусов для разработки тест-систем получали из мозга зараженных новорожденных белых мышей. 20% суспензию мозга в 5% растворе сахарозы смешивали с охлажденным ацетоном в центрифужных стаканах с емкостью 250 мл. Центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли. Восстанавливали объём осадка ацетоном, гомогенизировали и оставляли на 1 ч. в ледяной бане, периодически помешивая. Центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли и снова добавляли небольшое количество ацетона. После повторного центрифугирования ацетон удаляли. Осадок высушивали под вакуумом. Затем добавляли 0,1 М раствор трис-буфера pH=11,0. К полученной суспензии для инактивации вируса добавляли β-пропиолактон до конечного разведения 0,3% и оставляли при 4 °С на 18-20 ч., затем проводили центрифугирование в течение 1ч. при 10 тыс. об/мин. Специфичность полученных антигенов контролировали методом ИФА.

Получение иммунных асцитных жидкостей (ИАЖ)

Белым беспородным мышам (массой 20-22 г) вводили внутрибрюшинно по 0,2 мл 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и такой же объём адьюванта

Фрейнда. Иммунизацию мышей проводили последовательно пять раз в течение 5 недель. Первую инъекцию вирусосодержащим препаратом осуществляли без адьюванта. На следующие сутки вводили мышам внутрив брюшинно клетки саркомы 180/TG (1-10 млн. клеток). Объем образовавшейся иммуноасцитной жидкости варьировал от 5 до 12 мл от одной особи. ИАЖ центрифугировали при 1,5-2 тыс. об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость отбирали, определяли титр ИАЖ с помощью стандартной реакции торможения гемагглютинации. Для дальнейшей работы использовали образцы с титром не менее 1:5000.

Выделение иммуноглобулинов класса G

Иммуноглобулины выделяли по методике фирмы Sigma из гипериммунных ИАЖ. На хроматографическую колонку 7x1 см, содержащую протеин А (Sigma), наносили профильтрованные на мембранном фильтре ИАЖ при рН=7,4. Изменяя рН элюирующего буфера до 3,0 собирали глобулиновую фракцию. После элюирования глобулинов доводили рН раствора до 8,0.

Получение пероксидазных конъюгатов иммуноглобулинов

В работе использовали пероксидазу хрена в количестве 4 мг фирмы Sigma (тип IV, кат. № Р6782). На первом этапе её растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Затем добавляли 0,005 мл раствора периодата натрия (38,5 мг/мл), выдерживали 20 мин при комнатной температуре и после проводили фильтрацию на мембранном фильтре с 0,001М натрия ацетатного буфера (рН 4,4). Затем заменяли буфер на карбонатно-бикарбонатный буфер с рН 9,5. После чего добавляли 8 мг иммуноглобулина класса G в 1 мл 0,01 М натрий-карбонатного буфера с рН 9,5. В течение двух часов перемешивали при комнатной температуре и добавляли 0,1 мл раствора 4мг боргидрида натрия в дистиллированной воде, инкубировали 2 ч при 4⁰С и фильтровали на мембранном фильтре. Технология приготовления конъюгатов включала использование полупроницаемых ультрафильтрационных мембраны с размерами пор от 2 нм до 100 нм.

Реакция торможения гемагглютинации

Для постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) микрометодом использовали 0,4% суспензию гусиных эритроцитов на фосфатном буфере с оптимального для каждого конкретного вируса значения рН. Специфическую активность испытуемых сывороток, начиная с разведения 1:20 определяли против 4-8 гемагглютинирующих единиц антигенов вирусов. При постановке опытов контролировали гемагглютинирующую активность рабочего разведения антигена, неспецифическую агглютинирующую активность сывороток, наличие или

отсутствие в них термостабильных ингибиторов, антигемагглютинирующую активность заведомо положительных сывороток (ИАЖ).

Иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антигенов вируса денге (ИФА-денге-АГ)

Сорбцию полистироловых планшетов MediSorb (Nunc, Дания) проводили посредством внесения специфического и нормального (из ИАЖ незараженных мышей) иммуноглобулинов в объеме 100 мкл на лунки соседних рядов планшета. Иммуноглобулины предварительно разводили в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе (КББ) с рН 9,6. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37⁰С. Несвязавшийся иммуноглобулин удаляли, промывая лунки дважды 0,01М фосфатно-буферным раствором с 0,05% твина-20 (ФБР-т; рН 7,4). После этого в лунки вносили блокирующий раствор, содержащий бычий сывороточный альбумин (БСА) в ФБР-т и инкубировали в течении 45 мин. при температуре 37⁰С. Затем планшеты однократно промывали ФБР-т и высушивали в ламинарном шкафу в течение 3 ч. Исследуемые образцы (в разведении 1:100 в 1% растворе БСА в ФБР-т) вносили в парные лунки планшета (каждая проба тестировалась с нормальным и специфическими иммуноглобулинами) по 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37⁰С. Затем планшеты трижды отмывали ФБР-т. На следующем этапе вносили в каждую лунку по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении и выдерживали планшеты 1 ч при 37⁰С. Планшет промывали 6 раз ФБР-т и вносили по 100 мкл индикаторного раствора (1mM раствор тетраметилбензидина, 0,01% перекиси водорода в цитратном буфере (рН = 4.0)). Через 10-15 мин. останавливали реакцию посредством добавления во все лунки планшета по 100 мкл 1N серной кислоты (стоп-реагент). Учет реакции проводили в приборе μ -Quant (Bio-Tek Instruments, USA) при длине волны 450 nm, референсная длина волны - 620 nm. Результат считали положительным, если оптическая плотность (ОП) исследуемого образца в лунке со специфическим иммуноглобулином была больше 0.35 и в 3 и более раз превышая ОП этого же образца в лунке с нормальным иммуноглобулином. При этом ОП данного образца в лунке с нормальным иммуноглобулином не превышал 0,25. Положительными контролями служили антигены соответствующих вирусов, полученные методом сахарозо-ацетоновой экстракции. Функцию отрицательных контролей выполняли нормальные антигены, приготовленные из мозговых суспензий незараженных новорожденных белых мышей.

ИФА для выявления специфических антител класса М (ИФА-IgM)

ИФА для выявления IgM антител в сыворотках людей проводили методом

IgG (производство фирмы Sigma, США) против μ -цепи иммуноглобулина человека по 100 мкл в КББ (pH 9,5) и инкубировали в течение 18 ч при 4⁰C. После блокировки не связавшихся с антителами зон планшета вносили исследуемые сыворотки, разведенные 1:100 попарно по 100 мкл и инкубировали 2 ч в термостате при температуре 37⁰C. Для установления титра сывороток использовали двукратные разведения (1:100-1:204800). После четырёхкратной промывки ФБР-т (pH 7,4), в одну из 2 лунок вносили нормальный антиген, в другую-специфический вирусный антиген в рабочем разведении в ФБР-т. Инкубировали 1 час при 37⁰C.

Планшет промывали 6 раз ФБР-т и вносили по 100 мкл индикаторного раствора (1mM раствор тетраметилбензидина, 0,01% перекиси водорода в цитратном буфере (pH = 4.0)). Через 10-15 мин останавливали реакцию посредством добавления во все лунки планшета по 100 мкл 1N серной кислоты (стоп-реагент). Результат считали положительным, если ОП_{обр} в лунке со специфическим антигеном была больше 0.35, и в 3 и более раз превышает ОП_{обр} в лунке с нормальным антигеном, при ОП_{обр} в лунке с нормальным антигеном, не превышающим 0.25. Положительными контролями служили сыворотки крови, содержащие специфические антивирусные антитела класса M.

ИФА для выявления специфических антител класса G(ИФА-IgG)

Определение специфических IgG антител к вирусам денге, ЗН, КЭ проводили методом ИФА-IgG в 96-луночных полистироловых планшетах, на поверхности лунок которых сорбированы специфические поликлональные мышинные антитела IgG против соответствующего вируса в рабочей концентрации в КББ. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37⁰C. Промывали планшеты дважды ФБР-т для удаления несвязавшихся компонентов и вносили в нечетные ряды планшета специфический вирусный антиген, а в четные - нормальный (контрольный) антиген, разведенные в ФБР-т. Исследуемые сыворотки вносились попарно в 2 лунки (четного ряда и нечетного ряда) по 100 мкл в разведении 1:100 в ФБР-т, далее планшеты инкубировались в течение 1 часа при температуре 37⁰C. Затем планшеты 3 раза отмывали ФБР-т. Конъюгат анти-IgG человека (мышинные антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена) вносили во все лунки планшета по 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 1 часа при 37⁰C. Планшет промывали 6 раз ФБР-т и вносили по 100 мкл индикаторного раствора (1mM раствор тетраметилбензидина, 0,01% перекиси водорода в цитратном буфере (pH = 4.0)). Через 10-15 мин останавливали реакцию посредством добавления во все лунки планшета по 100 мкл 1N серной кислоты (стоп-реагент). Результат интерпретировали аналогично таковому при ИФА-IgM. Положительными контролями служили сыворотки крови, содержащие антитела класса G против соответствующих вирусов.

Определение IgM против ЛД с помощью тест-системы «Anti-Dengue

Тест-система "Anti-Dengue Virus ELISA (IgM)" производства фирмы "Euroimmun" основана на методе непрямого ИФА. В лунках иммуносорбента иммобилизован цельновирионный лизатный антиген вируса денге 2 типа, который связывает специфические антитела к вирусу денге. Инкубация с антивидовым конъюгатом (антиIgM человека, меченые пероксидазой хрена) выявляет специфические IgM по цветной реакции с субстратом. Все сыворотки крови разводятся в буферном растворе, содержащем RF-absorbent и инкубируются в течение 10 минут при комнатной температуре до внесения их в лунки планшета. Качественный учет результатов проводится путем сравнения ОП исследуемой сыворотки с ОП сыворотки-калибратора cut-off, входящей в состав набора. Сыворотки со значением ОП менее ОП cut-off считаются отрицательными, сыворотки со значением ОП более ОП cut-off - положительными.

Полуколичественный учет результатов предусматривает определение коэффициента Ratio для каждой сыворотки крови, и высчитывается по формуле:

ОП исследуемого образца / ОП сыворотки-калибратора = Ratio

Производитель рекомендует интерпретировать результаты следующим образом:

Ratio < 0,8 отрицательный результат

Ratio 0,8 - 1.1 сомнительный результат

Ratio 1.1 и > положительный результат

Наборы реагентов, используемые для исследования сывороток-контролей специфичности экспериментальных тест-систем

- набор реагентов «ИФА-Краснуха-IgM», тест система иммуноферментная для выявления антител класса М к вирусу краснухи, производства ЗАО «ЭКОлаб» № ФСР 2012/13239 от 20.03.2012.

-набор реагентов «ИФА-ЦМВ-IgM», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к цитомегаловирусу, производства ЗАО «ЭКОлаб» № ФСР 2007/01444 от 17.12.2007.

-набор реагентов «ИФА-ВПГ 1+2-IgM», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к вирусу простого герпеса I и II типа, производства ЗАО «ЭКОлаб» № ФСР 2007/01443 от 17.12.2007.

- набор реагентов «ВектоВЭБ-VCA-IgM» - тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови, производства ЗАО «Вектор – Бест» РУ № РЗН

Статистические методы

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным методикам, для оценки достоверности различий, полученных в экспериментах выборочных средних, использовали, в зависимости от их характера использовали непараметрический критерий Манна-Уитни или параметрический критерий Стьюдента. Различия считали достоверными для вероятности не менее Excel и IBM SPSS Statistics.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РАЗРАБОТКА ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ДЕНГЕ

Формат разрабатываемых тест-систем был выбран на основе данных литературы, в соответствии с которыми для выявления IgM к вирусам денге рекомендуется использование ИФА в формате MAC-ELISA (Innis B.L., 1989), а для выявления IgG – вариант непрямого ИФА (Valmaseda A., 2003; Koraka P., 2003; Talarmin A., 1998).

В связи с этим, содержанием разработки новых наборов явились получение специфических компонентов тест-систем – антигенов вируса денге, иммуноглобулинов класса G и конъюгата IgG с пероксидазой хрена, оценка их активности и подбор оптимальных концентраций специфических и неспецифических реагентов.

Оценка активности антигенов вируса денге в ИФА-АГ-денге

Двукратные последовательные разведения антигенов четырёх вирусов денге, в диапазоне от 1:100 до 1:204800 исследовали в ИФА на выявление антигенов вирусов денге «ИФА-АГ-денге». Каждое разведение антигенов вирусов денге 1-4 исследовали в парных лунках планшета с иммобилизированными специфическим и нормальным иммуноглобулином.

В таблице 2 приведены полученные средние значения оптической плотности в лунках с соответствующими разведениями антигенов. Как следует из представленных результатов, активность всех выделенных антигенов практически одинакова (рисунок 1). Значительное и статистически значимое отличие от ОП в лунках с нормальным иммуноглобулином свидетельствует о высокой специфичности вирусных антигенов, а отсутствие реакции в лунках с антигенами вирусов КЭ и ЗН достигается благодаря высокой специфичности мышинового иммуноглобулина G к вирусам денге.

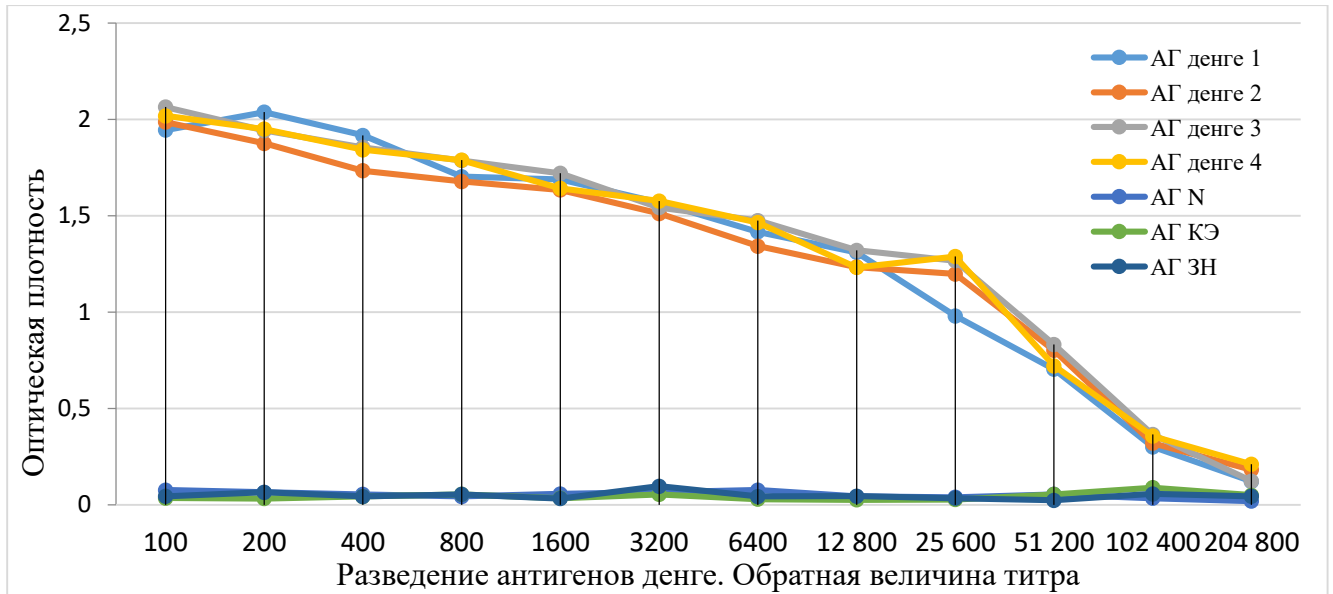


Рисунок 1 - Зависимости ОП реакционной смеси от степени разведения исследуемых образцов (антигенов)

Примечание: * нормальный иммуноглобулин

Оценка активности специфических IgG к вирусам денге

Оценку специфической активности приготовленных мышинных иммуноглобулинов класса G к вирусам денге проводили посредством их последовательных двукратных разведений в диапазоне от 40 мкг/мл до 0,3 мкг/мл в лунках планшета. Контролем служили аналогичные разведения нормального иммуноглобулина. Результаты исследования иллюстрированы рисунком 2. По результатам исследования было выбрано рабочее разведение IgG к вирусу денге – 10 мкг/мл

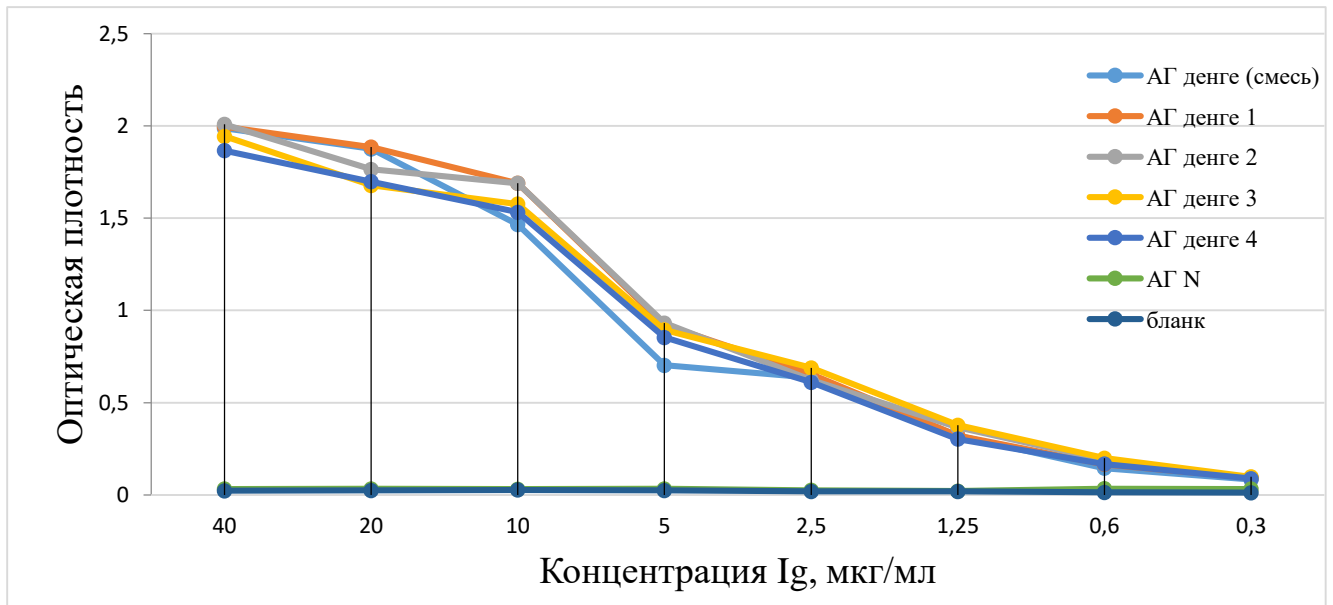


Рисунок 2 - Зависимость ОП реакционной смеси от концентрации использованного раствора IgG (иммуносорбент)

Примечание: * нормальный антиген

Оценка активности конъюгата денге (мышинные IgG к вирусам денге, меченные пероксидазой хрена)

Для оценки активности специфического конъюгата его титровали в ИФА-АГ-денге в разведениях от 1:50 до 1:51200; результаты исследования иллюстрированы рисунком 3. Приготовленный конъюгат не вступал в реакцию в ИФА с нормальным антигеном при минимальном разведении (1:50), что свидетельствовало о его высокой специфичности. По результатам исследования было выбрано рабочее разведение конъюгата – 1:1600.

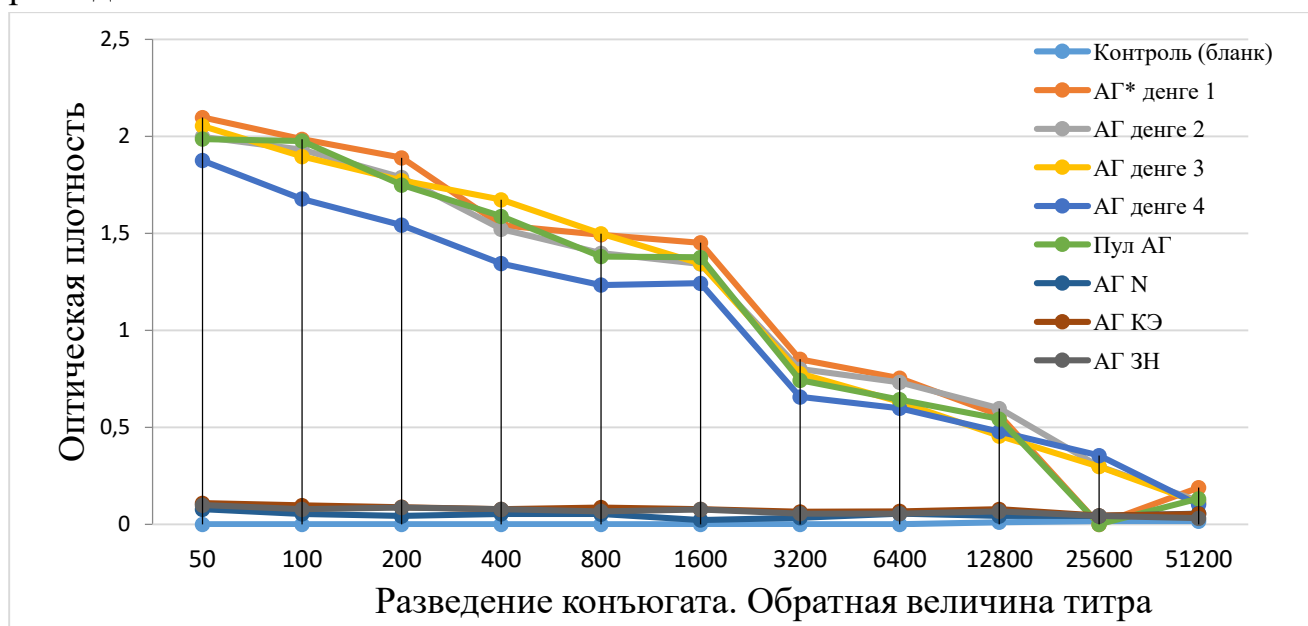


Рисунок 3 - Зависимость ОП реакционной смеси от степени разведения конъюгата иммуноглобулина к вирусу денге

Примечание: *- разведения антигенов 1:100

С использованием полученных антигенов вирусов денге 1, 2, 3, 4, глобулинов и конъюгатов были приготовлены моноспецифические ИФА-тест-системы для выявления IgM к этим вирусам (ИФА-IgM-денге 1, ИФА-IgM-денге 2, ИФА-IgM-денге 3, ИФА-IgM-денге 4), а также две тест-системы для определения IgM и IgG с использованием смеси антигенов четырёх типов вируса денге (ИФА-IgM-денге и ИФА-IgG-денге)(рисунок 4.).

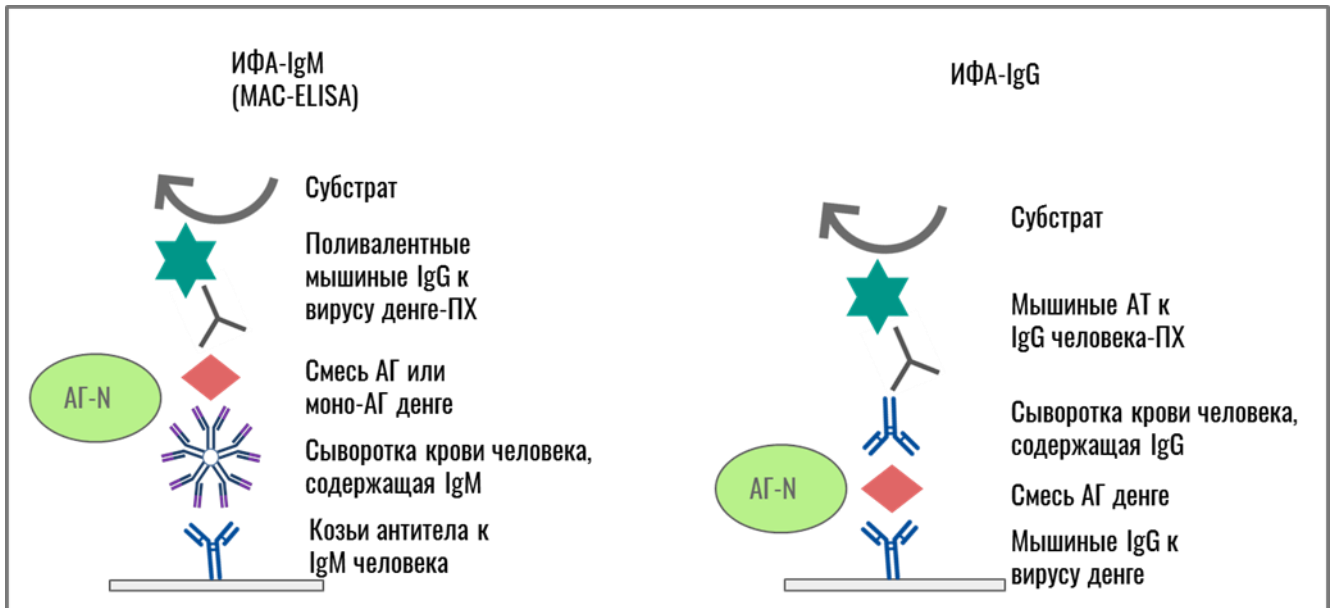


Рисунок 4 - Дизайн разработанных ИФА тест-систем

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IGM К ВИРУСУ ДЕНГЕ

Диагностическую эффективность (чувствительность и специфичность) экспериментальных тест-систем испытывали, исследуя образцы сывороток от больных ЛД, а также КЭ и ЛЗН. Для оценки диагностической эффективности «ИФА-IgM-денге» были обследованы 117 сывороток от больных ЛД и по 24 сыворотки от больных ЛЗН и КЭ, содержащие специфические IgM к соответствующим возбудителям. При обследовании сывороток в гомологичных тест-системах специфические антитела выявлялись в 100% случаев. При исследовании в тест-системе «ИФА-IgM-денге» гетерологичных сывороток крови только одна сыворотка из 24 от больных ЛЗН дала слабоположительный результат (4,2%). Средние геометрические значения титров антител IgM в сыворотках больных денге составляли $7,4 \pm 1,0 \log_2$ (1 : 167) на 1–3 сутки ($p < 0.001$), резко возрастая до $10,6 \pm 1,8 \log_2$ (1 : 1609) к концу первой недели ($p < 0.04$). В тест-системе «ИФА-IgM-КЭ» выявлено 2 положительных образца из 24 от больных ЛЗН (8,3%) и 2 слабоположительных образца из 117 от больных ЛД (1,7%). В тест-системе «ИФА-IgM-ЗН» выявлено 4 слабоположительных образца из 117 от больных ЛД (3,4%) и 2 слабоположительные пробы из 24 от больных КЭ (8,3%)(таблица 2).

Таблица 2 - Данные обследования сывороток крови больных ЛД (n=117), КЭ (n=24) и ЛЗН (n=24) в гомологичных и гетерологичных ИФА-IgM тест-системах

Категории сывороток	Тест-системы								
	«ИФА-IgM-денге»			«ИФА-IgM-КЭ»			«ИФА-IgM-ЗН»		
	<i>Исследованные сыворотки больных</i>								
	ЛД (n=117)	КЭ (n=24)	ЛЗН (n=24)	ЛД (n=117)	КЭ (n=24)	ЛЗН (n=24)	ЛД (n=117)	КЭ (n=24)	ЛЗН (n=24)
Положительные	117	-	-	-	24	2	-	-	24
Слабоположит.	-	-	1	2	-	-	4	2	-
Отрицательные	-	24	23	115	-	22	113	22	-

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования метода ИФА-IgM для дифференциальной диагностики флавивирусных заболеваний, однако наличие перекрестных серологических реакций в 4,2% случаев обязывает проводить верификацию этиологического агента путем сравнительного анализа титров антител в гетерогенных тест-системах.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IGG К ВИРУСУ ДЕНГЕ

Для оценки дифференциальной способности тест-системы "ИФА-IgG-денге" были исследованы 24 сыворотки от больных ЛД, 12 сывороток от больных КЭ и 19 сывороток от больных ЛЗН.

Указанные образцы были одновременно исследованы в тест-системах "ИФА-IgG-КЭ" и "ИФА-IgG-ЗН". При исследовании гомологичных сывороток все они были оценены как положительные в тест-системах "ИФА-IgG-денге" и "ИФА-IgG-ЗН", в тест-системе "ИФА-IgG-КЭ" из 12 исследованных образцов 11 образцов были оценены как положительные и 1 как слабopоложительный. Значительно более неопределенными были результаты исследования гетерологичных сывороток. Так, в тест-системе ИФА-денге-IgG» среди гетерологичных образцов положительными и слабopоложительными оказались 45,0 % сывороток, в тест-системе «ИФА-КЭ-IgG» этот показатель составил 44,2 %, а в «ИФА-ЗН-IgG» - 77,8 % (таблица 3.)

Таблица 3 - Данные обследования сывороток крови больных ЛД(n=24), КЭ(n=12) и ЛЗН(n=19) в ИФА-IgG в гомологичных и гетерологичных тест-системах

Категории сывороток	Тест-системы								
	«ИФА-IgG-денге»			«ИФА-IgG-КЭ»			«ИФА-IgG-ЗН»		
	<i>Исследованные сыворотки больных</i>								
	ЛД (n=24)	КЭ (n=12)	ЛЗН (n=19)	ЛД (n=24)	КЭ (n=12)	ЛЗН (n=19)	ЛД (n=24)	КЭ (n=12)	ЛЗН (n=19)
Положительные	24	4	6	16	11	-	18	9	19
Слабopоложит.	-	2	2	2	1	-	1	-	-
Отрицательные	-	6	11	6	-	19	5	3	-

Таким образом, результаты этих испытаний показали, что дифференциальная диагностика флавивирусных инфекций по наличию специфических IgG к их возбудителям практически невозможна из-за большого числа перекрестных реакций.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ «ИФА-IGM-ДЕНГЕ» И «ANTI-DENGUE VIRUS ELISA IGM» ПРОИЗВОДСТВА ФИРМЫ «EUROIMMUN» ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ

Оценка диагностической эффективности тест-систем была выполнена также в сравнительных испытаниях с единственным разрешенным к применению в России набором «Anti-dengue virus ELISA IgM» производства фирмы «Euroimmun»

(Германия). Были исследованы 88 сывороток крови больных ЛД. В тест-системе «ИФА-IgM-денге» во всех 88 сыворотках крови больных ЛД были обнаружены специфические IgM с титрами от 1:100 до 1:25600. При обследовании тех же проб в тест-системе «Anti-Dengue Virus ELISA (IgM)» было выявлено 80 положительных сывороток (90,9%), две сомнительных (2,3%) и 6 отрицательных (6,8%) (табл. 4). При чем три из последних содержали высокие концентрации антител класса М в системе «ИФА-IgM-денге». Для подтверждения этиологического агента для этих 6 случаев эти образцы исследовали в тест-системах «ИФА-IgG-денге» и «ИФА-IgG-ЗН», причем титры IgG, к антигенам вирусов денге превышали таковые к вирусу ЗН в 4 и более раз.

Таблица 4 - Результаты обследования сывороток крови больных ЛД, позитивных при постановке в тест-системе «ИФА-IgM-денге» и сомнительных или отрицательных в тест-системе «Anti-Dengue Virus ELISA (IgM)» (n=8)

№ сыворотки	Результаты обследования				
	«ИФА-денге-IgM»			«Anti-Dengue Virus ELISA (IgM)»	
	ОП	Титр IgM	Результат	Ratio	Результат
1	0,400	1:400	Положит.	0,5	Отрицат.
2	0,468	1:800	Положит	0,5	Отрицат.
3	0,459	1:800	Положит	0,5	Отрицат.
4	0,622	1:1600	Положит	0,4	Отрицат.
5	0,427	1:400	Положит	1,0	Сомнит.
6	0,653	1:1600	Положит	0,5	Отрицат.
7	0,530	1:800	Положит	1,0	Сомнит.
8	0,688	1:1600	Положит	0,7	Отрицат.

Для оценки специфичности двух сравниваемых тест-систем были обследованы 53 сыворотки крови больных гетерогенными вирусными инфекциями, содержащие IgM антитела к их возбудителям (43 образца – к ЦМВ, 6 - к ВЭБ, 2 – к ВПГ и 2 – к вирусу краснухи) по результатам предварительного исследования в соответствующих иммуноферментных тест-системах производства ЗАО «ЭКОлаб» и ЗАО «Вектор – Бест». По оценке в тест-системе «ИФА-IgM-денге» 51 сыворотка из 53 (96,2%) оказалась отрицательной, тогда как в тест-системе «Anti-Dengue Virus ELISA (IgM)» как отрицательные были оценены только 36 сывороток из 53 (67.9%).

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОНОВАЛЕНТНЫХ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ТИПОВ ВИРУСА ДЕНГЕ В КОНКРЕТНЫХ СЛУЧАЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

105 сывороток крови больных ЛД, содержащих группоспецифичные антитела класса М к вирусам денге, были исследованы в моноспецифичных ИФА-IgM тест-системах, а 23 образца из этих 105 были исследованы методом ОТ-ПЦР в ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. В результате исследования в моноспецифичных ИФА-IgM тест-системах идентифицировать типы вируса денге, вызвавшие заболевание, удалось в 39 образцах из 105 (37,1%). В 7 образцах (0,7%) были выявлены антитела к двум типам вирусов денге, в 11 образцах (10,4%) - к трём и в 48 образцах (45,7%) - к четырём типам. В итоге обследования 105 сывороток крови больных ЛД в моноспецифичных ИФА-IgM тест-системах (по результатам сравнения показателей ОП) в 39 случаях (37,1%) удалось идентифицировать типы вируса денге, вызвавшие заболевание. При обследовании 65 сывороток, взятых в первые 7 дней болезни, и 40 сывороток, взятых в период от 8 до 25 дня после начала заболевания, этиологическое значение одного из вирусов денге 1,2,3 и 4 типов (с учетом показателей ОП и титров антител) установлено в 41,5% и 30,0% случаев соответственно. 23 сыворотки крови больных были дополнительно обследованы методом ОТ-ПЦР. При этом в 21 пробе (92,0%), полученной на 3-13 дни болезни, была обнаружена РНК вирусов денге. Результаты идентификации типов вирусов денге методом ОТ-ПЦР и ИФА-IgM в моновалентном варианте, совпали в 14 случаях (66,7%) (таблица 5).

Таблица 5 - Идентификация вирусов денге, вызвавших заболевание ЛД, по результатам обследования 105 сывороток крови больных ЛД методом ИФА-IgM

Периоды болезни (дни).	Критерии идентификации		Всего		
	По оптической плотности	По титру IgM			
1-7 (n=65)	денге-1*	7/19**	5/8	12/27	
	денге-2	8/19	-	8/19	
	денге 3	2/19	3/8	5/27	
	денге 4	2/19	-	2/19	
Всего	19/65 (29,2%)		8/65 (12,3%)	27/65 (41,5%)	
8-25 (n=40)	денге-1*	4/11	1/1	5/12	
	денге-2	-	-	-	
	денге 3	4/11	-	4/11	
	денге 4	3/11	-	3/11	
Всего	11/40 (27,5%)		1/40 (2,5%)	12/40 (30,0%)	11/40 (27,5%)
	30/105 (28,6%)		9/105 (8,6%)	39/105 (37,1%)	

Примечания: *- тип вируса денге; **- число сывороток с IgM против данного типа вируса денге/общее число идентифицированных сывороток в этой подгруппе

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ СТАНДАРТНОГО ТУРНИКЕТ-ТЕСТА И ВЫЯВЛЕНИЯ РАННИХ IGG ПРИ РАЗВИТИИ ГЕМОМРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ

Проведенные исследования позволили также оценить эффективность использования тест-системы «ИФА-IgG-денге» для выявления ранних IgG к вирусу денге, которые, по рекомендации ВОЗ, наряду с положительным результатом стандартного турникет-теста и тромбоцитопенией являются прогностическим симптомом развития геморрагического синдрома денге.

В ИКБ №1 г. Москвы был обследован 101 образец сыворотки крови больных с диагнозом ЛД. 16 пациентам на основании положительного результата СТТ был поставлен диагноз ГЛД. В результате обследования сывороток в наборе реагентов «ИФА-IgG-денге» ранние специфические IgG были обнаружены в 5 (из 16-ти) сыворотках крови больных ГЛД. В двух пробах (№№ 1,2), взятых на 5 день заболевания, обнаружены IgG в низком титре, в остальных трёх (№№ 1185, 2137, 2094), взятых в более поздние сроки развития болезни, были обнаружены IgG в более высоком титре. Это соответствует картине антителообразования, характерной для классической денге. Среди сывороток от пациентов с классической ЛД ранние IgG были обнаружены у 11 пациентов. В 3 сыворотках (№№ 3,4,5) обнаружены IgG в высоком титре, что характерно для повторной инфекции денге. В целом, в 14 пробах, взятых с 3 до 10 дня болезни, обнаружены специфические IgG в высоком титре (1:800-1:102400). Из них только у трёх пациентов (№№ 3,4,5) наблюдался положительный результат СТТ и тромбоцитопения. У трёх (№№ 7,8,9) – только тромбоцитопения (таблица 6). Обнаружение IgG антител на ранней стадии заболевания в сыворотках как больных ГЛД, так и ЛД говорит о том, что развитие геморрагического синдрома может быть не связано с ранее перенесенной флавивирусной инфекцией. В то же время, очень высокие титры G антител у больных ГЛД, возможно, свидетельствуют в пользу того, что эти антитела вовлечены в механизм развития геморрагического синдрома денге.

Таблица 6 - Результаты обследования сывороток больных ЛД и ГЛД в ИФА-IgG

№ сыворотки	Диагноз	День болезни	Титр IgG	Количество тромбоцитов (x10 ⁹ /л)	Результат СТТ
1	ГЛД	5	1:200	126	+
2			1:100	78	+
3		7	1:6400	67	+
4			1:102400	53	+
5		10	1:102400	83	+
6			3	1:3200	Нет данных

7	ЛД	5	1:25600	60	-
8			1:800	84	
9		6	1:12800	58	-
10			1:3200	183	-
11		7	1:12800	157	-
12			1:6400	100	-
13			1:12800	142	-
14			1:6400	119	-
15		9	1:1600	58	-
16			1:3200	102	-

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработаны шесть видов оригинальных иммуноферментных наборов реагентов для серологической диагностики ЛД: четыре моновалентных ИФА-IgM (MAC-ELISA) для выявления специфических антител класса М к каждому из четырёх вирусов денге и два поливалентных для выявления группоспецифических IgG и IgM в сыворотке крови человека.
2. Установлена 100% диагностическая эффективность тест-системы "ИФА-IgM-денге" для верификации клинического диагноза ЛД у больных с 5 дня болезни.
3. Метод ИФА-IgM (MAC-ELISA) с разработанными наборами реагентов позволяет осуществлять дифференциальную диагностику ЛД от других flavivirusных инфекций, однако наличие перекрестных серологических реакций в 4,2 % случаев обязывает проводить верификацию этиологического агента путем сравнительного анализа титров антител в гетерогенных тест-системах.
4. Исследование сывороток крови от больных лихорадкой денге с использованием моновалентного варианта метода ИФА-IgM (MAC-ELISA) позволяет дифференцировать типы вируса денге, вызвавшего заболевание, в 37,1% случаев.
5. Применение ИФА тест-систем для выявления антител класса G к вирусам денге, клещевого энцефалита и Западного Нила, как правило, не позволяет дифференцировать эти инфекции, но может использоваться для серо-эпидемиологических исследований и как дополнительный подтверждающий тест.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты используются в практической работе лаборатории биологии и индикации арбовирусов подразделения НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Федерации для верификации завозных случаев ЛД у пациентов, госпитализированных в ГБУЗ "ИКБ №1 ДЗМ. Результаты проведенного исследования вошли в методические рекомендации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека МР 4.2.0108-16 "Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадка Денге".

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1 **Акиншина Ю.А.** Применение иммуноферментных тест-систем для диагностики ЛД / Ю.А. Акиншина, В.Ф. Ларичев, С.Г. Марданлы, А.М. Бутенко, Н.В. Хуторецкая, М.А. Сайфуллин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – №4. – С. 8 – 12.

2. **Акиншина Ю.А.** Сравнительное применение экспериментальной ИФА-тест-системы НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского "ИФА-IgM-денге" (Россия) и фирмы Euroimmun "Anti-dengue virus ELISA IgM" (Германия) для серодиагностики ЛД (ЛД)/ Ю.А. Акиншина, В.Ф. Ларичев., М.А. Сайфуллин, С.Г. Марданлы, А.М. Бутенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2017. – №22(1) – С. 4 – 8.

3. **Акиншина Ю.А.** Применение методов ИФА-IgM (MAC-ELISA) И ОТ-ПЦР для определения этиологической роли типов вируса денге в конкретных случаях заболевания / Ю.А. Акиншина, В.Ф. Ларичев., М.А. Сайфуллин, С.Г. Марданлы, А.М. Бутенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2017. – №22(3) – С.116-121.

4. **Акиншина Ю.А.** Определение диагностической ценности пробы жгута и выявления ранних IgG при развитии геморрагического синдрома ЛД / Ю.А. Акиншина, В.Ф. Ларичев., М.А. Сайфуллин, С.Г. Марданлы // Медицинский алфавит. – 2018. – № 5 (1). Современная лаборатория – С.54 – 56.

5. Сайфуллин М.А. Завозные случаи ЛД в Москве в 2009-2011 г.г. особенности клиники и лабораторных показателей / М.А. Сайфуллин, В.Ф. Ларичев, **Ю.А., Акиншина** и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – №6. – С.29 – 35.

6. Ларичев В.Ф., Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации / В.Ф. Ларичев, М.А. Сайфуллин, **Ю.А Акиншина** и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2012. -№1.- С.35 – 38.

7. Петрова И.С. Завозной случай японского энцефалита у российского туриста (2014). / И.С. Петрова, О.Б., Муравьев, Т.Н. Кузьменко, М.А. Сайфуллин, П.В. Бойцов, В.Ф. Ларичев, **Ю.А. Акиншина**, А.М. Бутенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2014 - №4. – С.60 – 62.

8. Ларичев В.Ф. Случаи завоза арбовирусных инфекций в Россию. Учебно-методическое пособие "Новые и возвращающиеся вирусные инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации"/ В.Ф. Ларичев, М.А. Сайфуллин, **Ю.А. Акиншина**, Н.В. Хуторецкая, А.М. Бутенко// Москва, Издательство первого МГМУ им. И.М. Сеченова. - 2014г. – С. 72 – 79.

9. Сайфуллин М.А. Случай ЛД с летальным исходом / М.А. Сайфуллин, Е.И. Келли, М.В. Базарова, В.Ф. Ларичев, Л.С. Карань, **Ю.А. Акиншина**, А.М. Бутенко // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2015 - №2 - С.49 – 51.

Список публикаций в других изданиях

1. Сайфуллин М.А., Случаи выявления ЛД в Москве 2009-2010 гг. / Сайфуллин М.А., Ларичев В.Ф., **Акиншина Ю.А.** и др. // Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням - 2011. – С.325

2. Сайфуллин М.А. Завозные случаи ЛД в Москве в 2009-2011 годах / Сайфуллин М.А., Ларичев В.Ф., **Акиншина Ю.А.** и др. // Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням - 2011. – С.329

3. Акиншина Ю.А. Особенности лабораторной диагностики лихорадки денге/ **Ю.А. Акиншина**, С.Г. Марданлы, В.Ф.Ларичев// В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под общей редакцией С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова, В.А. Киселевой. 2017. С. 9-10.

3. Saifullin M.A. Two Cases of Dengue Fever Imported from Egypt to Russia, 2017/ M. A Saifullin, V.P. Laritchev, Y.E. Grigorieva, N.N. Zvereva, A.M. Domkina, R.F. Saifullin, M.V. Bazarova, **Y.A. Akinshina**, L.S.Karan, A.M. Butenko // Emerg Infect Dis.- 2018-24(4). - doi: 10.3201/eid2404.172131.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВЭБ	вирус Эпштейн-Барр
ГЛД	геморрагическая лихорадка денге
ИАЖ	иммунная асцитная жидкость
ИФА	иммуноферментный анализ
КББ	карбонатно-бикарбонатный буферный раствор
КЭ	клещевой энцефалит
ЛД	лихорадка денге
ЛЗН	лихорадка Западного Нила
MAC-ELISA	M antibody capture enzyme linked immuno-sorbent assay
ОП	оптическая плотность
ОТ	обратная транскрипция
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
РТГА	реакция торможения гемагглютинации
ФБР	фосфатно-буферный раствор
ФБР-т	фосфатно-буферный раствор с твином
ЦМВ	цитомегаловирус
IgM, IgG	антитела (гаммаглобулины) классов М и G, соответственно