

Иммуноферментная тест-система для диагностики герпесвирусной инфекции шестого типа

С. С. Марданлы, м.н.с. отдела эпидемиологии¹, зам. генерального директора по коммерческим вопросам³

В. А. Арсеньева, ст. микробиолог отдела перспективных разработок³

Е. А. Амелина, к.б.н., нач. отдела перспективных разработок³

С. Г. Марданлы, д.м.н., проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин², президент и директор по науке³, акад. АМН, заслуженный работник здравоохранения России

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобразования Московской области, г. Орехово-Зуево, Московская обл.

³ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская обл.

ELISA test system for diagnosis of herpes virus infection of sixth type

S.S. Mardanly, V.A. Arsenyeva, E.A. Amelina, S.G. Mardanly

Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology n.a. honorary academician N.F. Gamalei, Moscow; State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region; ECOlab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; Russia Russia

Резюме

Разработан набор реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG» для определения в формате непрямого иммуноферментного анализа специфических антител класса G. Проведены предварительные клинические испытания с использованием сывороток детей от 0 до 18 лет (198 шт.), сывороток ВИЧ-инфицированных (40 шт.) и сывороток людей пожилого возраста (от 70 лет и выше) (133 шт.). Проведено исследование в ИФА с набором реагентов и его аналогами отечественного (ИФА) и зарубежного (РИФ) производства, что позволило рассчитать показатели диагностической информативности разработанного набора по ГОСТ Р 53022.3-2008. Полученные данные позволили начать регистрацию набора реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG» для проведения исследования на специфические антитела к ВГЧ-6, установления сероконверсии или диагностического нарастания антител.

Ключевые слова: герпесвирусные инфекции, вирус герпеса шестого типа, иммуноферментный анализ, клиническая информативность.

Summary

An ELISA-HHV6-IgG reagent kit has been developed for determining specific class G antibodies in the format of indirect immuno-enzyme analysis. Preliminary clinical trials were performed using sera of children from 0 to 18 years old (198 pcs.), HIV-infected sera (40 pcs.) and serums of people of advanced age (from 70 years and above) (133 pcs.). A study was conducted in an ELISA with a set of reagents and its analogues in domestic (ELISA) and foreign (RIF) production, which made it possible to calculate the diagnostic informativity indicators of the developed kit according to GOST R 53022.3-2008. The obtained data allowed starting the registration of the reagent kit IFA-HHC 6-IgG for conducting a test for specific antibodies to HHV-6, establishing a seroconversion or diagnostic increase of antibodies.

Key words: herpes virus infections, herpes virus of the sixth type, enzyme immunoassay, clinical informativity.

Герпесвирусы (*Herpesviridae*) — большое семейство ДНК-вирусов, среди них выделяют восемь представителей семейства, патологичных для человека. Инфекции, вызываемые герпес-вирусами, являются актуальной проблемой современной медицины. Это связано с их повсеместной распространенностью, частой манифестацией в грудном и раннем возрасте, существованием в организме человека в разных формах (острых, хронических, латентных). Герпесвирусные инфекции могут являться причиной развития многих соматических и онкологических заболеваний, неонатальной смертности, заболеваемости новорожденных и ранней инвалидизации детей.

В последние годы активно изучают различные аспекты эпидемиологии, клиники и диагностики инфекции, вызванной относительно малоизвестным герпесвирусом человека шестого типа (ВГЧ-6). [3, 4, 12]. Согласно международной классификации ВГЧ-6 — это ДНК-вирус подсемейства *Betaherpesvirinae* рода *Roseolovirus*, имеет два серологических подтипа: 6А и 6В [7]. Подтипы А и В различаются по эпидемиологии, географическому распространению, свойствам роста, последовательности нуклеотидов, сероэпидемиологии и причастности к различным заболеваниям [1]. Вирус герпеса типа 6 подтипа А связывают с синдромом хронической усталости,

рассеянным склерозом, угнетением иммунитета и прогрессированием ВИЧ-инфекции [2]. Вирус герпеса типа 6 подтипа В вызывает внезапную экзантему и энцефалит у детей, фебрильные судороги и эпилепсию, поражение ЦНС (энцефалит, менингоэнцефалит, церебеллит), острые гепатиты, в том числе злокачественные формы с фульминантным течением.

Острая инфекция ВГЧ-6 может протекать с сильной лихорадкой без видимого очага инфекции; имеются данные, указывающие на участие ВГЧ-6 в развитии злокачественной В-клеточной лимфомы, саркоидоза, синдрома Шерена, лимфогранулематоза, рассеянного склероза, аутоиммунного тиреоидита [5, 9–12].

В связи с тем, что ВГЧ-6 является близким по своему строению и свойствам к ЦМВ, играющему важную роль в формировании перинатальной патологии, обсуждается его роль в патологии плода и новорожденных. Маркеры ВГЧ-6 были обнаружены в органах и тканях детей, умерших от тяжелой неонатальной патологии. В связи с вышеизложенным особую актуальность своевременная диагностика ВГЧ-6 инфекции приобретает в современной педиатрии.

Инфекция может принимать генерализованную или латентную форму, в культуре клеток легко возникает персистентная инфекция. Резервуаром латентной инфекции являются слюнные железы и ткани мозга, также моноциты и клетки-предшественники костного мозга [7].

Инфицирование герпес-вирусом шестого типа происходит, как правило, в раннем детстве, и соответственно около 95% взрослых имеют антитела к ВГЧ-6. В большинстве случаев и инфицирование, и персистирование ВГЧ-6 происходят бессимптомно. Реактивация ВГЧ-6 обуславливает смертность и болезнь среди пациентов после пересадки органов и костного мозга, а также у больных СПИД. У лиц с иммунодефицитом ВГЧ-6 может быть причиной лихорадки, снижения функции и отторжения трансплантата, пневмонии, гепатитов, поражений ЦНС. Высокую опасность ВГЧ-6 представляет для реципиентов костного мозга.

Вообще инфекция, вызванная вирусом герпеса типа 6, — не редкость в России, но диагноз устанавливается крайне редко [11].

Диагноз острой герпетической инфекции, причиной которой является ВГЧ-6, ставится на основании совокупности клинических данных и комплекса лабораторных методов (иммунохимических и молекулярно-биологических). Обнаружение ВГЧ-6 ДНК в плазме и определение высокого титра вируса — более чувствительный метод для диагностики первичной инфекции (около 90%), однако это может свидетельствовать и о реактивации инфекции. ПЦР с использованием обратной транскриптазы, разработанная недавно, позволяет

надежно дифференцировать латентную инфекцию ВГЧ-6 и реактивацию инфекции.

Среди иммунохимических — метод иммуноферментного анализа, который характеризуется высокой чувствительностью (99%) и специфичностью (95%). Первичная (активная инфекция) по определению может быть идентифицирована выявлением диагностически значимого уровня антител класса IgM в образце сыворотке (плазме) крови или значимого роста концентрации антител IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом в 2–4 недели.

Однако не у всех детей, переносящих первичную инфекцию ВГЧ-6, отмечается продукция антител IgM, а приблизительно 5% здоровых взрослых имеют антитела IgM к ВГЧ-6. В связи с тем, что практически у всех взрослых выявляют IgG к ВГЧ-6, обнаружение специфических антител в одном образце незначимо. К тому же повышение их титра не позволяет дифференцировать первичную инфекцию от реактивации. Следовательно, только комплексный анализ полученных результатов позволяет правильно определить стадию инфекции ВГЧ-6 и подбирать рациональную терапию [6]. В комплексе диагностических реакций на инфекцию ВГЧ-6 значимое место занимает иммуноферментное выявление специфических IgG установления сероконверсии или диагностического нарастания антител [12].

Целью настоящего исследования являлась оценка диагностической эффективности разработанного набора реагентов для выявления специфических антител класса G к ВГЧ-6 методом иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Иммуноферментная тест-система для определения иммуноглобулинов класса к ВГЧ-6 была сконструирована в формате метода непрямого твердофазного ИФА. Для приготовления иммуносорбента использовали рекомбинантный очищенный антиген вируса герпеса человека шестого типа (ЗАО «ЭКОлаб» кат. № 41.44) и разборные полистироловые планшеты для иммунологических реакций с плоским

дном (Nunc, Дания, кат. № 446469). Конструкция рамки планшета позволяет проводить дробные постановки (от 1 до 12 стрипов), что делает удобным использование набора как в крупных, так и в небольших лабораториях, где поток исследований невелик.

Постановку ИФА проводили в два этапа. На первом этапе в лунки планшета вносили исследуемые сыворотки, при наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса шестого типа происходит связывание их с антигеном ВГЧ-6, сорбированным на твердом носителе. На следующем этапе образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью пероксидазного конъюгата на основе моноклональных антител г IgG человека («ЭКОлаб», кат. № 40.06).

Образовавшийся комплекс «антиген — антитело — конъюгат» выявляется в реакции с субстратно-индикаторным раствором, содержащим хромоген — тетраметилбензидин («ЭКОлаб», кат. № 40.07), в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически после остановки окислительно-восстановительного процесса 0,5 М серной кислоты. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации выявляемых специфических антител к ВГЧ-6 в испытуемых образцах.

Учет и интерпретация результатов исследования проводили по критическому уровню оптической плотности ($ОП_{крит.}$). Образец с оптической плотностью выше $ОП_{крит.}$ считался положительным.

Общее время исследования составляет полтора часа с учетом этапов промывания стрипов между инкубациями.

Между этапами инкубаций из реакционной зоны удаляли все не вступившие в реакцию компоненты промыванием раствора, приготовленного из 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином ФСБ-Т ($\times 25$).

Исследовали образцы сывороток, предоставленных диагностическим центром ЗАО «Эколаб» El Clinic и ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи»,

Таблица 1
Результаты определения IgG к возбудителю герпеса человека шестого типа

Результат исследования	ИФА «Вектор-Бест»	ИФА ЗАО «ЭКОлаб»	ИФА «Вектор-Бест»	ИФА ЗАО «ЭКОлаб»	ИФА «Вектор-Бест»	ИФА ЗАО «ЭКОлаб»
	Дети		ВИЧ-инфицированные		Лица пожилого возраста	
Положительный	115	94	14	13	78	78
Неопределенный	7	5	3	4	3	2
Отрицательный	76	99	23	23	52	53
Всего	198	198	40	40	133	133
Процент совпадения результатов	85		90		95	

лечебно-профилактическими учреждениями (ЛПУ) — стационарами и поликлиниками Люберецкого района Московской области.

В качестве наборов сравнения использовали разрешенные к применению в России ИФА тест-системы производства «Вектор-Бест» — «ВектоННВ-6-IgG», каталожный номер D-2166. В случае получения дискордантных результатов в качестве референс тест-системы использовался набор реагентов IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgG Assay производства SCIMEDX (США).

Обработку полученных результатов проводили с учетом критериев Стьюдента [10].

Результаты и обсуждение

Клинические испытания для определения качественных характеристик разработанного нами набора реагентов, предназначенного для IgG определения к ВГЧ-6, проводились в два этапа.

На первом этапе исследовались 158 образцов сывороток, содержащих антитела класса G к вирусу герпеса шестого типа и 34 образца сывороток, не содержащих таких антител, предоставленных и охарактеризованных ранее диагностическим центром ЗАО «ЭКОлаб» El Clinic и ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи». На этом охарактеризованном клиническом материале определялись чувствительность и специфичность

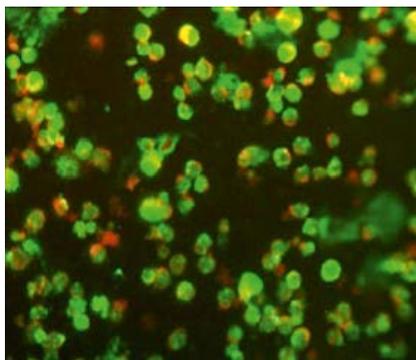


Рисунок 1. Положительный результат ИФА.

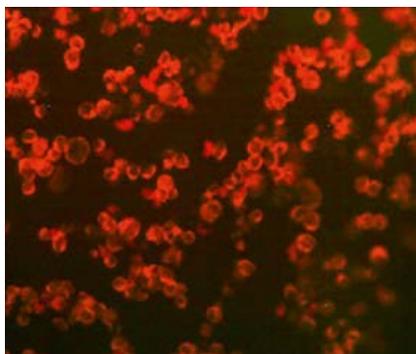


Рисунок 2. Отрицательный результат ИФА.

нового набора реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG». Чувствительность определялась как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составила 100%. Специфичность — как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составила также 100%.

На втором этапе проводилось исследование 371 образца сывороток

крови, полученных из ЛПУ — стационаров и поликлиник Люберецкого района Московской области. Из них 198 — сыворотки детей от 0 до 18 лет; 40 — сыворотки ВИЧ-инфицированных лиц и 133 — образцы сывороток людей пожилого возраста (от 70 лет и выше). В качестве наборов сравнения использовали разрешенные к применению в России ИФА тест-системы производства фирмы «Вектор-Бест» «ВектоННВ-6-IgG», каталожный номер D-2166. В случае получения дискордантных результатов в качестве референс тест-системы использовался набор реагентов IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgG Assay производства SCIMEDX (США), основанный на методе непрямой иммунофлюоресценции. Результаты, полученные в отношении каждой из обследованных групп, сведены в табл. 1.

Совпадение показателей для положительных, неопределенных и отрицательных результатов при определении специфических IgG составило от 80 до 95%.

Выявлены расхождения в результатах определения IgG к лицам пожилого возраста в 6 (4,51%) из 133 случаев, к ВИЧ-инфицированным лицам — в 4 (10,00%) из 40, к детям — в 29 (14,6%) из 198. 39 клинических образцов, с которыми установлены дискордантные результаты в ИФА, дополнительно изучены в ИФА с набором реагентов IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgG Assay производства фирмы SCIMEDX (США). Результаты исследования в реакции непрямой иммунофлюоресценции (интерпретацию результатов см. на рис. 1, 2) были сопоставлены с результатами ИФА.

Совпадения результатов нового набора реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG»

Таблица 2
Сравнительная оценка информативности нового наборов реагентов

Показатель информативности, %	Набор реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG»
Клиническая чувствительность	96,82%
Клиническая специфичность	97,13%
Диагностическая эффективность	96,97%

и набора сравнения IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgG Assay составили 69,2% (27 из 39 определений). Следует учитывать, что неопределенный результат в реакции иммунофлюоресценции не предусмотрен.

По совокупности совпадающих результатов исследования в ИФА и IFA проведена завершающая аттестация клинических образцов по содержанию в них специфических IgG, а также осуществлены расчет и сравнительная оценка информативности (клинической чувствительности, специфичности и диагностической эффективности) нового наборов реагентов (табл. 2).

Представленные данные позволили прийти к заключению о высокой диагностической эффективности применявшегося набора реагентов. Российский набор реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG» имеет высокие показатели клинической информативности, что позволяет его рекомендовать для скрининга герпес-инфекции шестого типа в заинтересованных медицинских организациях любого типа.

Заключение

Результаты испытания набора реагентов «ИФА-ВГЧ-6-IgG» для определения в формате непрямого иммуноферментного анализа специфических антител класса G показали, что по своим характеристикам он не уступает зарегистрированным отечественным и зарубежным аналогам и может быть рекомендован для широкого использования в клинико-диагностических лабораториях с целью выявления антител класса G к ВГЧ-6 в комплексе диагностических реакций установления инфекции ВГЧ-6 и ее стадии.

Список литературы

1. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clinical Microbiology reviews* 2005; 18: 217–245.
2. www.hhv-6foundation.org/overview.html.
3. Абатуров А. Е., Шостакович-Корецкая Л. Р. HHV-6-инфекция у детей. *Инфекции у детей*. 2007. Т. 3 (6): pediatric.mif-ua.com/archive/issue-28/article-390/.
4. Волосовец А. П., Кривоустов С. П., Дзюба О. А., Сребный М. М., Победимская Л. А., Вовк Г. Н. и др. Клиническое наблюдение герпетической экземы у двухлетнего мальчика. *Здоровье ребенка*. 2008. № 4 (13): pediatric.mif-ua.com/archive/issue-7045/article-7198/print.html.

5. Детская и перинатальная смертность в России: тенденции, структура, факторы риска // Социальные аспекты здоровья населения. 2008. № 1. Документ доступен по адресу: vestnik.mednet.ru/.
6. Калугина М. Ю., Каражас Н. В., Рыбалкина Т. Н., Бошняк Р. Е., Ермакова Т. М., Тебеньков А. В. Актуальность диагностики инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го // *Детские инфекции*. 2012. № 1. С. 60–63.
7. Каражас Н. В., Малышев Н. А., Рыбалкина Т. Н., Калугина М. Ю., Бошняк Р. Е., Кистенева Л. Б., Чешик С. Г. Герпетические инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. Методические рекомендации. М., 2007.
8. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. 2001. С. 407.
9. Мелёхина Е. В., Музыка А. Д., Калугина М. Ю., Горелов А. В., Чугунова О. А. Современные представления об инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа // *Архив внутренней медицины*. — 2016. — № 1 (27). — С. 12–19.
10. Никольский М. А., Радыш М. В. Роль вирусов герпеса человека 6 и 7-го типов в возникновении фебрильных судорог у детей // *Вопросы диагностики и педиатрии*. 2012. Т. 4. № 4. С. 46–48.
11. Никольский М. А. Инфекция, вызываемая вирусом герпеса человека 6 типа у детей: современное состояние проблемы // *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2008. — № 2. — С. 93–96.
12. Никольский М. А., Мессорош В. Г., Минченко С. И. Сероконверсия и нарастание концентрации IgG-антител при инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008. № 4: <http://www.medlit.ru/eib/eid080422.htm>.

Санofi Пастер выводит на российский рынок вакцину Адасель — комбинированную вакцину для ревакцинации против дифтерии, столбняка и коклюша у детей с 4-х лет, подростков и взрослых

29 августа 2018 г. Санofi Пастер, подразделение вакцин Группы Санofi, объявила о выводе на российский рынок впервые зарегистрированной в РФ вакцины Адасель — комбинированной вакцины для ревакцинации против столбняка, дифтерии и дополнительно против коклюша. Новая вакцина от производителя Пентаксим® может использоваться для ревакцинации против дифтерии и столбняка в 6–7 и 14 лет в соответствии со сроками Национального календаря прививок и для дополнительной защиты против коклюша.

Согласно Национальному календарю профилактических прививок (НКПП), плановый курс первичной вакцинации предусматривает проведение прививок от коклюша, дифтерии и столбняка детям первого и второго года жизни. Последующие ревакцинации (повторные вакцинации) против дифтерии и столбняка проводятся в возрасте 6–7 лет, 14 лет, а также взрослым (каждые 10 лет с момента последней прививки). Однако в НКПП включена лишь одна ревакцинация против коклюша, которая проводится ребенку в возрасте 18 месяцев. Многочисленные клинические исследования показывают, что поствакцинальный иммунитет к коклюшу угасает в среднем в течение 5 лет после последней прививки, и к младшему школьному возрасту восприимчивость к инфекции возвращается. Таким образом, дети этой возрастной группы снова становятся уязвимыми в отношении коклюша.

Именно поэтому в последнее время наблюдается рост заболеваемости коклюшем и увеличение среди заболевших доли детей дошкольного, школьного и подросткового возраста. Важно, что именно дети школьного возраста являются одним из основных источников инфекции для непривитых детей первых месяцев жизни, у которых коклюш протекает особенно тяжело.

«Коклюш — острая бактериальная инфекция, особенно опасная для детей раннего возраста, основным симптомом которой является длительный (до 3 месяцев) приступообразный спазматический кашель. Заболевание зачастую требует госпитализации и лечения антибиотиками. Предотвратить заболевание можно с помощью своев-

ременной и правильной вакцинации. Важно, что иммунитет к коклюшу после вакцинации сохраняется в среднем около 5 лет и к школьному возрасту он, в основном, утрачивается — независимо от типа используемой коклюшной вакцины (цельноклеточной или бесклеточной), подчеркивает Сусанна Михайловна Харит, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний Научно-исследовательского Института детских инфекций ФМБА, — Позиция Роспотребнадзора РФ подтверждает целесообразность дополнительной ревакцинации от коклюша в возрасте 6–7 лет».

Сейчас появилась возможность дополнительно защитить детей дошкольного и школьного возраста от коклюша во время проведения плановых повторных вакцинаций от дифтерии и столбняка. Помимо дифтерийного и столбнячного анатоксина комбинированная вакцина Адасель содержит еще пять очищенных коклюшных антигенов (коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин и агглютиногены фимбрий 2-го и 3-го типа).

Программы ревакцинации против коклюша доказали свою эпидемиологическую эффективность в снижении общей и младенческой заболеваемости коклюшем во многих странах. По данным Всемирной организации здравоохранения, 2-я ревакцинация против коклюша в возрасте 4–6 лет включена в календари около полусотни стран мира (включая США, Канаду, большинство стран Европы, ряд стран СНГ). 3-я ревакцинирующая доза в возрасте 9–17 лет включена в календари нескольких десятков стран мира. Согласно исследованиям, проведенным в Голландии, клиническая эффективность ревакцинации против коклюша дошкольников составила 79%⁴.

В настоящий момент вакцина Адасель зарегистрирована в 67 странах мира и хорошо изучена в ходе международных клинических исследований с участием более 20 тыс. человек. При применении у детей и взрослых, вакцина продемонстрировала высокую иммуногенность каждого компонента и высокий профилактический эффект (до 75%), переносится аналогично вакцине для ревакцинации против дифтерии и столбняка).