

ЛИТЕРАТУРА

1. Abuja P.M., Zenz A., Trabi M. et al. The cyclic antimicrobial peptide RTD-1 induces stabilized lipid-peptide domains more efficiently than its open-chain analogue. *FEBS Letters*. 2004, 566: 301-306.
2. Buffy J.J., McCormick M.J., Wi S. et al. Solid-state NMR investigation of selective perturbation of lipid bilayers by cyclic antimicrobial peptide RTD-1. *Biochemistry*. 2004, 43: 9800-9812.
3. Garcia A.E., Цсары G., Tran P.A. et al. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring θ -defensin isoforms from baboon leukocytes. *Infect. Immun*. 2008, 76: 5883-5891.
4. Lehrer R., Barton A., Daher K. et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 1989, 84: 553-561.
5. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S.L. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*. 1991, 137:167-173.
6. Lehrer R.I., Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev*. 2012, 245: 84-112.
7. Pace C.N., Vajdos F., Fee L. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 1995, 4: 2411-2423.
8. Stegemann C., Tsvetkova E.V., Aleshina G.M. et al. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010, 24:599-604.
9. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999, 286: 498-502.
10. Tran D., Tran P., Roberts K. et al. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008, 52: 944-953.
11. Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Shamova O.V. et al. α -Defensins from blood leukocytes of the monkey *Papio hamadryas*. *Biochemistry (Moscow)*. 2006, 71: 879-883.
12. Tsvetkova E.V., Leonova L.E., Aleshina G.M. et al. Antimicrobial effects of α -defensins from leukocytes of the hamadryas baboon *Papio hamadryas*. *J. Evolutionary Biochemistry Physiology*. 2016, 52(2): 133-140.
13. Varkey J., Nagaraj R. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005, 49: 4561-4566.
14. Weiss T.M., Yang L., Ding L. et al. Two states of cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers. *Biochemistry*. 2002, 41: 10070-10076.
15. Yamaguchi S., Hong T., Waring A. et al. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry*. 2002, 41: 9852-9862.

Поступила 06.03.18

Контактная информация: Цветкова Елена Викторовна, к.б.н.,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, р.т. (812)328-21-82

© Т.А.ЧЕКАНОВА, С.Н.ШПЫНОВ, И.В.ТАРАСЕВИЧ, 2018

Т.А.Чеканова, С.Н.Шпынов, И.В.Тарасевич

АВИДНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG К RICKETTSIA PROWAZEKII КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЫПНОГО ТИФА И ЕГО РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ФОРМЫ — БОЛЕЗНИ БРИЛЛЯ-ЦИНССЕРА

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Исследование диагностической значимости индекса авидности (ИА) антител класса G к *R. prowazekii* наряду с определением специфических IgG и IgM. *Материалы и методы.* В ИФА определяли IgG/IgM к *R. prowazekii*, их титры и ИА IgG в 112 образцах сывороток крови (47 сывороток от вакцинированных против сыпного тифа лиц и 65 образцов от больных и/или переболевших эпидемическим сыпным тифом и/или болезнью

Брилья, включая 18 сывороток, собранных во время расследования вспышки сыпного тифа в 1998 г. в Липецке). *Результаты.* Определены методологические подходы для оценки ИА IgG к *R. prowazekii*. Начальный период (возможно, разгар) эпидемического сыпного тифа серологически доказан в 8 случаях: в двух сыворотках выявлением только IgM к *R. prowazekii*, в 6 образцах наряду с IgM были определены IgG к *R. prowazekii* с низкими или средними значениями ИА. В 19 образцах одновременно выявлены IgM и высокоавидные IgG к *R. prowazekii*, что серологически свидетельствовало о болезни Брилья. В 2 из 47 сывороток вакцинированных установлен низкий ИА при значимых титрах IgG. *Заключение.* ИА IgG к *R. prowazekii* имеет высокую прогностическую ценность, прежде всего, для проведения дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилья-Цинссера.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 73—80

Ключевые слова: *Rickettsia prowazekii*, авидность антител, специфические IgG и IgM, эпидемический сыпной тиф, болезнь Брилья-Цинссера, дифференциальная диагностика

T.A.Chekanova, S.N.Shpynov, I.V.Tarasevich

AVIDITY OF IGG TO *RICKETTSIA PROWAZEKII* AS AN ADDITIONAL CRITERION FOR THE SEROLOGICAL DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF THE EPIDEMIC TYPH AND ITS RECRUDESCENT FORM — BRILL-ZINSSER DISEASE

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim: to investigate the diagnostic significance of avidity index (AI) for IgG to *R. prowazekii* with the determination of specific G and M class antibodies. *Materials and methods.* IgG/IgM to *R. prowazekii*, their titers and AI of IgG were measured in ELISA in 112 serum samples (47 sera from typhus-vaccinated individuals and 65 samples from patients and/or convalescents of epidemic typhus and/or Brill-Zinsser disease, including 18 sera collected during Lipetsk epidemic typhus outbreak in 1998). *Results.* Methodological approaches for estimation of AI for IgG to *R. prowazekii* have been determined. The initial period (or acute) of epidemic typhus we serologically detected in 8 cases by identifying of IgM to *R. prowazekii* only in two sera and IgM as well as IgG to *R. prowazekii* with low or medium values of AI in 6 samples. In 19 samples from patients we indicated Brill-Zinsser disease due to the presence in them specific IgM and IgG to *R. prowazekii* with high values AI. In 2 sera from vaccinated persons was established a low AI of IgG at significant diagnostic titers. *Conclusion.* AI of IgG to *R. prowazekii* has high prognostic information for differential diagnosis of epidemic typhus and Brill-Zinsser disease.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 73—80

Key words: *Rickettsia prowazekii*, avidity of antibodies, specific IgG and IgM, epidemic typhus, Brill-Zinsser disease, differential diagnosis

ВВЕДЕНИЕ

Способность *Rickettsia prowazekii* к латентной персистенции в организме переболевшего эпидемическим сыпным тифом (ЭСТ) и активации его метаболических процессов вследствие различных стрессовых ситуаций, приводящей, даже спустя многие годы, к развитию рецидива заболевания, известного как болезнь Брилья-Цинссера (болезнь Брилья, возвратный сыпной тиф), обеспечивает не только длительное сохранение возбудителя в популяции, но и потенциальную возможность возникновения спорадических случаев и вспышек ЭСТ при благоприятных для этого условиях (наличие переболевших ЭСТ, платяной педикулез, ухудшение экономических и социальных условий, высокая миграционная активность населения) [2, 4, 5].

Дифференциальная диагностика ЭСТ и болезни Брилья (ББ) является важной составляющей эпидемиологического расследования вспышек или спорадических случаев, а также мониторинга за заболеваемостью этими двумя нозологическими формами. В настоящее время методологические подходы и рекомендации для диф-

ференциации ЭСТ и бБ, предложенные еще в 60-е годы прошлого столетия, имеют ряд противоречий. Традиционно считается, что при ЭСТ наблюдается формирование на ранних этапах иммуногенеза макроглобулиновых 19S-антител (IgM), а позднее — 7S-антител (IgG), в то время как при бБ уже с первых дней выявляются только 7S-антитела [2, 8, 16, 20]. Вместе с тем, в работах ряда исследователей [12] представлены убедительные лабораторные данные выявления IgM к *R. prowazekii* наряду со специфическими IgG у больных бБ в диагностически значимых титрах, что оставляет вопрос о дифференциальной диагностике ЭСТ и бБ, основанный на разграничении 19S и 7S-антител, открытым.

В последние годы появились многочисленные публикации, свидетельствующие о целесообразности дополнительного изучения avidности специфических антител к различным патогенам для разграничения первичной острой формы, рецидива и пастинфекции. Оценка индекса avidности (ИА) IgG в качестве индикатора срока первичного инфицирования впервые предложена в 1989 г. Hedman K. M. et al. [13]. Во время раннего иммунного ответа IgG нацелены на множественность различных эпитопов патогена с относительно низкой avidностью, дальнейший клональный отбор приводит к формированию высокоавидных антител, направленных, в основном, на ограниченное число иммунодоминантных эпитопов белков возбудителя. ИА возрастает по мере увеличения длительности инфекции. На сегодняшний день разработаны, по большей части, в формате иммуноферментного анализа (ИФА) тесты для определения avidности антител к вирусам (краснухи, гепатитов, иммунодефицита человека, Зика, денге, кори, клещевого энцефалита, парвовирусу B19, герпесвирусам), простейшим (*Toxoplasma gondii*), возбудителям инфекций бактериальной природы (коклюша, дифтерии, Лайм-боррелиоза) [6, 9, 11, 14, 15, 17, 18]. Вместе с тем, нет работ, посвященных анализу avidности специфических антител при риккетсиозах.

Принимая во внимание факт, что этиологически обе нозологические формы (ЭСТ и бБ) обусловлены одним возбудителем, без изменения его иммунобиологических свойств [4], представляет несомненный интерес проведение сравнительного анализа ИА IgG к *R. prowazekii* в сыворотках крови больных ЭСТ и бБ.

Целью работы явилось пилотное исследование диагностической значимости ИА антител класса G к *R. prowazekii* наряду с определением специфических IgG и IgM в сыворотках крови больных/переболевших ЭСТ и бБ, а также вакцинированных против сыпного тифа лиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследованы 112 лиофилизированных сывороток крови людей из рабочей коллекции лаборатории экологии риккетсий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, содержащие по данным первичного скрининга в ИФА специфические антитела классов G и/или M к *R. prowazekii*: 47 сывороток крови от вакцинированных против сыпного тифа лиц и 65 образцов от больных и/или переболевших ЭСТ и/или бБ, включая 18 сывороток крови, полученных в январе-феврале 1998 г. от больных во время эпидемиологического расследования последней официально зарегистрированной в России вспышки ЭСТ в психоневрологическом диспансере Липецка. Лиофилизированные образцы непосредственно перед исследованием были восстановлены добавлением изотонического раствора.

Первичный скрининг сывороток с целью выявления IgG и IgM к *R. prowazekii* проводили в ИФА с помощью разработанной нами экспериментальной тест-системы. Для получения иммуносорбента использовали высокоочищенный растворимый протективный антиген вирулентной культуры *R. prowazekii* (штамм Брейнль) из коллекции лаборатории экологии риккетсий, полученный по Голинович Е.М. и др. [1], который разводили до концентрации 4-5 мкг/мл по основному белку в 0,02M карбонат-бикарбонатном буфере, pH-10,8 и сорбировали в полистироловых планшетах. Состав тест-системы включал многокомпонентный раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата (РРОК); контрольные положительные (К+) и отрицательные (К-) образцы, содержащие и не содержащие соответственно анти-

тела к *R. prowazekii*; конъюгаты антител козы против IgG и IgM человека, меченных пероксидазой хрена (ПХ) производства ООО «Имтек», Россия в подобранных разведениях; фосфатно-солевой раствор с добавлением 0,1% твина-20 (ФСР-Т); однокомпонентный водный раствор 3',5'-тетраметилбензидаина (ТМБ) производства ЗАО «Иммунотех», Россия; стоп-реагент (0.75 М серная кислота).

Схема проведения ИФА включала последовательные стадии: разведение на РРОК испытуемых и контрольных образцов 1:100, их инкубирование в лунках иммуносорбента в течение 1 ч при 37 °С, 6-кратную промывку иммуносорбента ФСР-Т, 1-часовую экспозицию при 37 °С с конъюгатами (для определения антител класса G к *R. prowazekii* вносили конъюгат анти-IgG человека с ПХ в рабочей концентрации, для определения антител класса M к *R. prowazekii* — рабочее разведение конъюгата анти-IgM человека с ПХ). После 6-кратной промывки иммуносорбента ФСР-Т вносили ТМБ на 15-20 мин, реакцию останавливали добавлением стоп-реагента, проводили измерение оптического поглощения (ОП) в лунках с помощью ридера при длине волны 450 нм. Для каждого вида исследования (определение IgG и IgM) рассчитывали ОПкрит добавлением к среднему значению ОП (К-) коэффициента 0.2. Если ОП исследуемого образца превышала или была равной ОПкрит, его считали положительным на наличие IgG и/или IgM к *R. prowazekii*. Дополнительно оценивали конечные титры IgG и IgM к *R. prowazekii*.

Образцы, содержащие антитела класса G к *R. prowazekii*, были изучены в тесте на avidность IgG в ИФА с применением экспериментальной тест-системы с небольшой модификацией в постановке анализа. Сыворотки крови в разведении 1:100 вносили параллельно в две лунки иммуносорбента и инкубировали 1 ч при 37 °С. После стандартной однократной промывки иммуносорбента в одну лунку (контроль) вносили ФСР-Т, в другую (опыт) — ФСР-Т с добавлением денатурирующего раствора (мочевина в конечной концентрации 8 М) и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Нами были проведены предварительные исследования по влиянию различных концентраций мочевины и времени экспозиции раствора в опытных лунках (стандартное 6-кратное промывание или выдержка денатурирующего раствора в течение 5, 10, 15 мин при комнатной температуре) и выбраны оптимальные условия для эффективного разрушения низкоавидных антител. После заключительной стандартной двукратной промывки всего планшета ФСР-Т во все лунки вносили рабочее разведение конъюгата анти-IgG человека с ПХ и инкубировали 1 ч при 37 °С. На присутствие в образце низкоавидных антител или с переходной (средней) avidностью указывало снижение ОП в лунке, обработанной денатурирующим раствором, по сравнению с контрольной. Индекс avidности (ИА) антител рассчитывали по формуле: $IA = \frac{OP_{опыт}}{OP_{контроль}} \times 100 \%$, где $OP_{опыт}$ — ОП образца в опытной лунке, $OP_{контроль}$ — ОП образца в контрольной лунке.

Для оценки влияния на ИА IgG антител класса M проводили дополнительные исследования по редукции последних в сыворотках крови, содержащих IgM к *R. prowazekii* с помощью 0,2 М раствора 2-меркаптоэтанолa [10], приготовленному на изотоническом растворе, добавленном в равном объеме к сывороткам (опытная группа). Контрольная группа представляла собой те же сыворотки, смешанные в равном объеме с изотоническим раствором. Пробы опытной и контрольной групп инкубировали 1 ч при 37 °С. Полноту редукции IgM оценивали в ИФА. В лунки планшета, сорбированным *R. prowazekii*, вносили сыворотки контрольной и опытной групп, разведенные 1: 50 РРОК (конечное разведение с учетом преаналитического — 1:100). Оценивали IgG и IgM к *R. prowazekii*, ИА IgG.

Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам первичного скрининга в ИФА только в двух образцах из 112 исследуемых были выявлены исключительно IgM к *R. prowazekii* в титрах 1:800. Сыворотки крови получены от двух пациентов психоневрологического диспансера Липецка, заболевших во время вспышки ЭСТ. Отсутствие IgG к *R. prowazekii* наряду

с клинической картиной, характерной для ЭСТ, безусловно, свидетельствует о раннем периоде заболевания эпидемическим сыпным тифом.

В 26 образцах были выявлены антитела к *R. prowazekii* двух классов — IgG и IgM, а в 84 сыворотках крови детектировали только иммуноглобулины класса G. Сыворотки, содержащие IgG к *R. prowazekii* (n=110), были оценены на ИА специфических антител класса G.

Учитывая ограниченность выходных данных для большинства образцов (клинический диагноз — ЭСТ или ББ; сроки взятия крови, прошедшие со дня инфицирования или вакцинации), в нашей работе мы приняли следующие критерии, которые впоследствии, по мере накопления опытных наблюдений, могут быть уточнены: низкоавидными считали антитела класса G при ИА ≤ 50%, антитела с переходной (средней) авидностью, если показатель ИА антител находился в диапазоне 51 — 69%, высокоавидными считали IgG при ИА ≥ 70%.

Распределение ИА антител класса G к *R. prowazekii* в группах сывороток, содержащих по данным скрининга оба класса иммуноглобулинов IgG + IgM (n=26) — 1 группа или только IgG (n=84) — 2 группа, представлены в табл. 1. В обеих группах чаще определяли высокоавидные антитела. Процентное содержание низкоавидных антител класса G было выше в группе образцов, в которых наряду с IgG к *R. prowazekii* были выявлены специфические IgM, а антител со средней авидностью — в образцах из группы 2. Процентное содержание сывороток крови, в которых IgG имели ИА с низкой или средней авидностью, в обеих группах было приблизительно одинаковым, как и образцов с высокоавидными иммуноглобулинами. Низкоавидные IgG к *R. prowazekii*, выявленные одновременно со специфическими IgM в 6 образцах, вероятнее всего, свидетельствуют об ЭСТ в его начальном периоде.

Нами была также проведена сравнительная оценка ИА IgG и титров специфических иммуноглобулинов обоих классов (табл. 2 и 3).

Результаты, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что в группе образцов, содержащих оба класса иммуноглобулинов к *R. prowazekii*, по мере нарастания авидности IgG, диапазон их титров сдвигается в сторону увеличения. Однако мы отмечали, что две сыворотки с низкой авидностью IgG имели титр 1: 3200, как и в трех образцах среди 19 с высокими показателями ИА. В сыворотках крови, содержащих только иммуноглобулины класса G к *R. prowazekii* (табл. 3), с ростом ИА отмечалось и увеличение титров IgG в большинстве случаев при некоторых исключениях. Таким образом, судить о давности срока инфицированности, полагаясь на их титры без оценки их динамического изменения, некорректно в силу особенностей иммунной системы пациента (сопутствующие иммунодефицитные состояния, аутоиммунные заболевания, иммуносупрессивная терапия и прочее).

Для оценки возможного влияния на показатели

Таблица 1. Распределение в группах исследованных сывороток (n=110) ИА IgG к *R. prowazekii*

Группы образцов	Количество образцов с разными ИА IgG (% содержание образцов в группе)		
	ИА ≤ 50%	51% < ИА < 69%	ИА ≥ 70%
1 группа	6 (23,1%)	1 (3,8%)	19 (73,1%)
2 группа	4 (4,8%)	16 (19,0 %)	64 (76,2 %)

Таблица 2. Оценка ИА IgG и титров антител к *R. prowazekii* в сыворотках крови, содержащих специфические иммуноглобулины классов G и M (n=26)

Группы образцов по величине ИА (число образцов)	Оценка средних значений ИА IgG и титров IgG/IgM		
	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG	Диапазон титров IgM
≤ 50 % (n = 6)	39,7 ± 5,1	1:100 — 1:3200	1:100 — 1:800
51% < ИА < 69% (n=1)	60,3	1:800	1:00
≥ 70% (n = 19)	96,4 ± 6,3	1:3200 — 1:51200	1:100 — 1:800

Таблица 3. Оценка ИА и титров IgG к *R. prowazekii* в сыворотках крови, содержащих только специфические иммуноглобулины класса G (n=81)*

Группы образцов по величине ИА (число образцов)	Оценка средних значений ИА и титров IgG	
	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG
≤ 50 % (n = 4)	42,9 ± 3,7	1:100 — 1:1600
51% < ИА < 69% (n=16)	59,3 ± 6,3	1:100 — 1:6400
≥ 70% (n = 61)	89,4 ± 8,0	1:200 — 1:51200

Примечание. * 3 образца были исключены из рассмотрения, т.к. ОП образцов в разведении 1: 100 превышала ОПкрит менее чем в 1,2 раза.

Таблица 4. ИА и титр IgG в образцах после редукции IgM 2-меркаптоэтанолом (n=26)

Образцы, распределенные на группы по величине ИА (число образцов)	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG
≤ 50 % (n = 6)	36,5 ± 6,1	1:100 — 1:1600
51% <ИА< 69% (n=1)	57,9	1:800
≥ 70% (n = 19)	92,1 ± 5,1	1:3200 — 1:51200

выявления IgM к *R. prowazekii* при параллельном тестировании на одном иммуносорбенте образцов после обработки 0,2 М раствором 2-меркаптоэтанолом (опытная группа) и без обработки (контроль). Средние значения ОП необработанных сывороток составили $0,983 \pm 0,102$, в то время как предварительно обработанные 2-меркаптоэтанолом образцы достоверно стали серонегативными, со средними значениями ОП $0,154 \pm 0,011$ (различия между группами достоверны, $p < 0,05$). Было установлено, что вышеуказанная преаналитическая обработка практически не затрагивала ИА IgG и их титр (табл.4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Безусловно, методологический подход серологической дифференциальной диагностики ЭСТ и бБ, основанный на предварительной редукции 19S-антител в сыворотках крови больных с последующей оценкой титров в специфических реакциях с *R. prowazekii*, заслуживает внимания и имеет практическое значение. Впервые такая дифференциация была осуществлена Murray E. et al. в 1965 г. в реакции связывания комплемента (РСК) с использованием 2-меркаптоэтанолом [16], затем З.А.Вороновой в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с применением цистеина [20]. Однако эффективность такого подхода отмечалась на ранних сроках инфицирования, в среднем, до 20 дня, после которого она снижалась и практически утрачивала свою целесообразность [2]. Необходимо отметить, что помимо тотального разрушения 19S-антител (IgM) сульфгидрилредуцентами (мочевина, цистеин, 2-меркаптоэтанол, диэтиламин и другие), их короткое действие в определенных концентрациях и условиях оказывает также влияние на разрыв или ослабление связей антигена с «ранними» иммуноглобулинами (низкоавидными), практически не затрагивая комплекс с высокоавидными антителами. Широкое изучение авидности антител нашло развитие в клинической лабораторной диагностике инфекционных заболеваний лишь в конце прошлого столетия. Кроме того, только в 1965 г. в соответствии с первой классификацией иммуноглобулинов, принятой Всемирной Организацией Здравоохранения, 19S-антитела были признаны IgM, а 7S-антитела — IgG. Применение методов (РСК, РНГА и другие) длительное время в диагностике риккетсиозов без отдельного определения классов специфических антител способствовало укреплению мнения, что в организме больного бБ, в отличие от ЭСТ, определяются только IgG к *R. prowazekii*, независимо от стадии заболевания.

В свете современных знаний об авидности антител, установленного рядом исследователей факта выявления специфических IgM к *R. prowazekii* при бБ и полученных нами данных мы предполагаем, что:

в начальный период эпидемического сыпного тифа количество специфических IgM превалирует над суммарным количеством IgG (или же последние отсутствуют), редукция 19S-антител (IgM) закономерно приведет к снижению титров сывороток после обработки по Вороновой З.А. или Murray E. et al.; в последующем, при появлении низкоавидных IgG, происходит их превалирование над IgM, и это возможно верифицировать в тесте на авидность;

при болезни Брилля специфические IgG преобладают в количественном соотношении над имеющими место IgM, по аналогии с другими латентно персистирующими инфекциями в стадии рецидива;

при эпидемическом сыпном тифе авидность IgG нарастает постепенно, при этом в разгар заболевания и даже в период реконвалесценции (первые 1-2 месяца) они не будут высокоавидными; при болезни Брилля специфические IgG являются высокоавидными с начала заболевания;

ИА IgG макроглобулиновых антител (19S, IgM) были проведены исследования по редукции IgM 2-меркаптоэтанолом в 26 сыворотках крови, содержащих по данным скрининга антитела обоих классов к *R. prowazekii* с последующей оценкой ИА и титров IgG. Полная редукция антител класса М была доказана в ИФА в тесте для

выявление высокоавидных IgG в отсутствии IgM к *R. prowazekii* свидетельствует о перенесенном ЭСТ или бБ (более 3-6 месяцев назад) или о протективном поствакцинальном иммунном ответе;

выявление антител класса G с переходной (средней) авидностью в присутствии IgM требует дополнительного подтверждения характера иммунного ответа через некоторое время и может свидетельствовать о более позднем периоде заболевания или формировании поствакцинального ответа;

выявление антител класса G с переходной авидностью в отсутствии IgM требует дополнительного подтверждения характера иммунного ответа через некоторое время, может свидетельствовать о более позднем периоде заболевания или наблюдаться у вакцинированных лиц в период формирования антител или у давно вакцинированных лиц с динамикой к снижению защитных свойств антител.

Полученные нами данные позволили сделать предположение о наличии 19 случаев бБ среди 112 исследуемых с помощью предлагаемого подхода: во всех этих сыворотках наряду со значимыми диагностическими титрами IgM определялись высокоавидные антитела класса G. Достоверно известны архивные сведения только по двум образцам сывороток крови больных бБ с подтвержденным клиническим диагнозом, которые мы также серологически верифицировали не иначе как болезнь Брилля. В структуре этой группы следует выделить 2 образца, полученных от двух пациентов во время липецкой вспышки, где наряду со значимыми титрами IgM — 1:400 и 1:800, были выявлены высокие титры IgG 1:25600 — 1:51200 с ИА, близкими к 100%.

Отдельного внимания заслуживает ретроспективный анализ 18 образцов сывороток, собранных в январе-феврале 1998 г. при эпидемиологическом анализе вспышки ЭСТ в психоневрологическом диспансере Липецка, который позволил нам сделать определенные выводы в контексте изначально ограниченных и противоречивых сведениях о ней. Известно, что своевременную информацию по факту появления первого случая заболевания получить не представилось возможным. Проведенное эпидемиологическое расследование позволило предположить начало неблагополучия по сыпному тифу в диспансере в конце 1997 г. Однако анализ движения больных показал, что за 2 месяца до официальной регистрации вспышки (в декабре 1997 г.) из стационара были выписаны 50 человек, причем трое из них переболели сыпным тифом [7,8]. Следовательно, не исключена возможность ее начала еще в октябре 1997 г. и даже раньше на фоне отдельных спорадических случаев. Сведения о количестве бБ противоречивы, но чаще фигурировали в сообщениях об одном-двух таких пациентах. Расходятся также цифры о количестве заболевших ЭСТ [5, 7, 8, 19].

Как мы уже отмечали, 2 пациента, по нашим последним экспериментальным данным, на момент взятия крови имели рецидив сыпного тифа (бБ). У двух больных мы детектировали только специфические IgM. В пяти образцах наряду с IgM определили низкоавидные IgG к *R. prowazekii*, еще в одном случае — IgG с переходной авидностью. Таким образом, 8 сывороток крови могли принадлежать больным ЭСТ в начальном периоде или в периоде его разгара (вероятно, не более 1-2 месяцев с момента заболевания). В остальных 8 сыворотках из 18 изученных при отсутствии IgM к *R. prowazekii* нами были выявлены высокоавидные IgG, что, скорее, свидетельствует о более раннем инфицировании сыпным тифом сроком более 3 месяцев.

В 47 образцах от вакцинированных против сыпного тифа лиц не были выявлены IgM к *R. prowazekii*. Образцов, содержащих высокоавидные антитела класса G, было большинство (n=32), а со средними показателями ИА — 13 сывороток. Два образца содержали низкоавидные IgG, по одному из которых нам была доступна информация об отмечаемом снижении титров антител к *R. prowazekii* в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и РСК на протяжении 3 лет. На момент забора крови титр в РНИФ — 1:20, РСК с антигеном *R. prowazekii* — 0. Титр IgG в экспериментальной иммуноферментной тест-системе — 1:800, ИА IgG — 34,8%. Имеются исследования, доказывающие необходимость изучения ИА поствакцинальных антител для оценки их защитных свойств от некоторых вакциноуправляемых инфекций и принятия решения о ревакцинации [3, 9].

Таким образом, дополнительное изучение авидности специфических антител может предоставить много прогностически ценной информации для эпидемиологов

и инфекционистов в диагностике риккетсиозов. Данная пионерская работа позволяет по-новому представить решение проблемы серологической дифференциальной диагностики ЭСТ и бБ. Изучение avidности IgG наряду с выявлением антител классов G и M к R. prowazekii позволит дополнить существующий диагностический алгоритм при ведении больных ЭСТ и бБ с верификацией нозологической формы, успешно проводить ретроспективный анализ вспышек и спорадических случаев сыпного тифа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиневич Е.М., Воронова З.А., Гудима О.С., Фрязинова И.Б., Бочарова Т.В. Химическая сыпнотифозная вакцина. Сообщение I. Иммуногенная субстанция риккетсий Провачека, ее получение и характеристика. Вестник АМН СССР. 1969, 10: 63-77.
2. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. М., Медицина, 1972.
3. Краева Л.А., Алексеева Е.А., Ценева Г.Я., Липатова Л.А. Беспаслова Г.И. Современные подходы к комплексным лабораторным исследованиям на дифтерию. Инфекция и иммунитет. 2012, 2(4):729-734.
4. Лукин Е.П., Воробьев А.А., Махлай А.А. Элементы патогенеза риккетсиозов в свете современных данных. Вестник РАМН. 1999, 12:7-13.
5. Лукин Е.П. К 100-летию открытия возбудителя эпидемического сыпного тифа — *Rickettsia prowazekii* (H. da Rocha Lima, 1916). Вернется ли сыпной тиф в Россию и Европу? Журнал инфектологии. 2015, 7(3):5-21.
6. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Автореф. дисс. д.м.н. М., 2016.
7. Савельев С.И., Шукина И.А., Мищук В.И., Зубова Н.Ю., Бондарев В.А., Герман К.М., Слюсарева Г.П., Иванова А.А., Фетисова Н.Ф., Комарова А.И., Умнова Н.С., Тарасевич И.В. Вспышка эпидемического сыпного тифа в Липецкой области. ЗНиСО. 1998, 1:7-11.
8. Тарасевич И.В., Боев Б.В. Сыпной тиф и математическое моделирование эпидемического процесса. Смоленск: МАКМАХ, 2013.
9. Caborij R.N., Maertens K., Dobby A. et al. Influence of maternal vaccination against diphtheria, tetanus, and pertussis on the avidity of infant antibody responses to a pertussis containing vaccine in Belgium. Virulence. 2017, Oct 3; 8(7):1245-1254.
10. Capel P.J., Gerlag P.G., Hagemann J.F., Koene R.A. The effect of 2-mercaptoethanol on IgM and IgG antibody activity. J. Immunol. Methods. 1980. 36(1):77-80.
11. Gaudy-Graffin C., Lesage G., Kousignian I. et al. Use of an anti-hepatitis C virus (HCV) IgG avidity assay to identify recent HCV infection. J. Clin. Microbiol. 2010 Sep; 48(9):3281-3287.
12. Faucher J.F., Socolovschi C., Aubry C. et al. Brill-Zinsser disease in Moroccan man, France, 2011. Emerg. Infect. Dis. 2012 Jan; 18(1):171-172.
13. Hedman K., Lappalainen M., Soderlund M., Hedman L. Avidity of IgG in serum diagnosis of infection diseases. Rev. Med. Microbiol. 1993, 4:123-129.
14. Lappalainen M., Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann. Ist. Super Santa. 2004, 40(1): 81-88.
15. Lau L., Green A. M., Balmaseda A., Harris E. Antibody avidity following secondary Dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. J. Clin. Virol. 2015, Aug; 69: 63-67.
16. Murray E., Gaon J., O'Connor J., Mulahasanovic M. Serological studies of primary epidemic typhus and rescrudent typhus (Brill-Zinsser disease). Differences in complement-fixation antibodies: high antigen requirement and heat lability. J. Immunol. 1965, 94:723-733
17. Rauer S., Beitlich P., Neubert U. et al. Avidity determination of *Borrelia burgdorferi*-specific IgG antibodies in Lyme disease. Scand. J. Infect. Dis. 2001, 33 (11):809-811.
18. Sirin M.C., Agus N., Yilmaz N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, Rubella virus and Cytomegalovirus among pregnant women and the importance of avidity assays. Saudi Med. J. 2017, Jul; 38(7): 727-732.
19. Tarasevich I., Rydkina E., Raoult D. Outbreak of epidemic typhus in Russia. Lancet. 1998, 352(9125): 353-358.
20. Voronova Z.A. Differentiation of 19S and 7S rickettsial antibodies by passive haemagglutination reaction with cysteine. Acta Virol. 1968, Jan; 12(1):73-77.

Поступила 04.04.18

Контактная информация: Чеканова Татьяна Александровна, к.б.н., 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-43-10

А.М.Седов¹, А.Н.Наровлянский¹, А.В.Пронин¹, А.В.Санин¹, И.К.Зубашев¹, А.В.Измestьева¹,
А.М.Иванова¹, Т.М.Парфенова¹, А.Е.Шульженко², И.Н.Зуйкова², Р.В.Шубелко², А.А.Халдин³,
Д.Р.Исаева³, Е.П.Селькова⁴, Е.А.Григорьева¹

МЕХАНИЗМ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ПРЕПАРАТА ФОРТЕПРЕН® ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва; ²Государственный научный центр Институт иммунологии, Москва; ³Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии; ⁴Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского

Цель. Изучение механизма противовирусного действия и оценка клинической эффективности, безопасности и переносимости терапии препаратом Фортепрен® у пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации. **Материалы и методы.** Клинические исследования проводил лекарственный препарат Фортепрен® (натрия полипренилфосфат) раствор для инъекций, 4 мг/мл, который вводили пациентам, прошедшим базовый курс препарата Ацикловир-Акри® для снятия острой фазы заболевания. Исследование проводили на 80 пациентах мужского и женского пола, отобранных в процессе скрининга с подтвержденным диагнозом хроническая рецидивирующая герпесвирусная инфекция генитальной локализации (ХРГВИ). Было сформировано 2 группы. Пациентам 1 группы (экспериментальной) Фортепрен® в дозе 2 мл (8 мг) вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно с интервалом в 21 день на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания 10-дневного базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир таблетки по 400 мг — 13±2, 34±2 и 55±2 день от начала исследования. Пациентам 2 группы (контрольной) раствор плацебо в объеме 2 мл вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир таблетки по 400 мг — 13±2, 34±2 и 55±2 день от начала исследования. Для оценки эффективности применения препарата Фортепрен® использовали такие критерии как: увеличение продолжительности межрецидивного периода, уменьшение частоты рецидивов за весь период наблюдения; снижение выраженности рецидивов, оцененное в баллах, изменение иммунологических показателей по динамике изменения продукции основных цитокинов. **Результаты.** В 1 группе пациентов межрецидивный период за весь период проведения исследования статистически значимо увеличился с 29,36±2,16 до 42,98±3,29 суток. В то время как во 2 группе изменения этого показателя не отмечено. Соответственно у пациентов 1 группы отмечено статистически достоверное сокращение частоты рецидивов ХРГВИ с 3,03±0,02 до начала лечения до 1,94±0,19 во время лечения при отсутствии снижения частоты рецидивов в контроле. Оценка в баллах выраженности рецидивов ХРГВИ у пациентов группы 1 указывает на эффективность данной схемы лечения. Сумма баллов средних значений балла выраженности признаков ХРГВИ статистически достоверно снизилась в 1 группе с 7,36±0,35 баллов на 1 визите до начала лечения до 4,75±0,35 баллов во время лечения. Во 2 группе изменений не отмечено. Уровень лейкоцитарного вирус-индуцированного интерферона (ЛВИ—ИФН) у пациентов экспериментальной группы повысился к завершению клинического исследования с 36 до 64% по сравнению с контрольной группой, в которой не наблюдалось прироста титров ЛВИ-ИФН. Оценка продукции ИФН α , ИФН γ , ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-15, ИЛ-2, ИЛ-4, МИФ-1 α , ФНО α показала увеличение их количества к завершению исследования у пациентов, получавших препарат Фортепрен®, по сравнению с контрольной группой. **Заключение.** Показана эффективность применения препарата Фортепрен® в дозе 2 мл (8 мг) при внутримышечном введении пациентам с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации на стадии ремиссии трехкратно с интервалом в 21 день на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания 10-дневного базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 81—87

Ключевые слова: генитальный герпес, клинические исследования, Фортепрен®, эффективность, механизм действия, безопасность и переносимость