

Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции

Л. М. Рустамова, С. Ф. Семенов, Н. Л. Богданова, А. С. Владыко, А. Г. Красько

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Поступила 09.11.2015. Принята к публикации 22.04.2016.

Своевременная диагностика особо опасных инфекций, вызванных вирусами Ласса и Эбола, является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий в случае завоза заболевания на территорию республики Беларусь. Основным методом быстрого реагирования при выявлении геморрагических лихорадок Ласса и Эбола, по-прежнему, является метод непрямой иммунофлуоресценции. В работе представлена разработка набора для выявления антител к особо опасным вирусным инфекциям Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ» ТУ ВУ 100558032.194–2011.

Ключевые слова: особо опасные вирусные инфекции; аренавирусы; вирус Ласса; филовирусы; вирус Эбола; антитело, метод непрямой иммунофлуоресценции.

Библиографическое описание: Рустамова ЛМ, Семенов СФ, Богданова НЛ, Владыко АС, Красько АГ. Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 115–119.

В последние годы происходят существенные изменения эпидемических проявлений геморрагических лихорадок Ласса, Эбола, Марбург. Очевидна глобализация эпидемического процесса — масштабность, рост заболеваемости, сокращение интервалов между эпидемическими вспышками, нарастание опасности распространения инфекции из очага на эндемичные территории.

В соответствии с положениями Международных медико-санитарных правил, являющихся основополагающим документом в деле создания и обеспечения эффективного функционирования механизмов предупреждения вспышек заболеваний, имеется целый ряд государственных обязательств и обязанностей для сдерживания международного распространения эпидемий. Необходимость обеспечения биологической безопасности обусловлена сохраняющейся угрозой распространения опасных и особо опасных инфекций, что связано с неблагополучной эпидемической ситуацией в мире. По итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении вспышки лихорадки Эбола в 2014 г. в Западной Африке, после дискуссий и обсуждения представленной информации Комитетом сделано следующее заключение: вспышка Эбола в Западной Африке представляет «чрезвычайное событие» и риск для здоровья населения в других странах; возможные последствия дальнейшего международного распространения особенно серьезны ввиду вирулентности и контагиозности вируса [1]. Обратной стороной прогресса транспортного сообщения и глобализации является угроза распространения возбудителя инфекции из очага на другие территории. Существуют стойкие природные очаги особо опасных инфекций на территории государств, с которыми имеются постоянные взаимоотношения, функционирует ряд объектов, представляющих биологическую опасность, возможны террористические акты с применением биологических поражающих агентов [2, 3]. Поэтому государство должно быть готово к такому развитию событий и

иметь в арсенале средства и методы диагностики, что является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий и обеспечения безопасности здоровья населения страны. Одним из простых и относительно дешевых методов диагностики при быстром реагировании для выявления геморрагических лихорадок является метод непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ). Потребности Республики Беларусь, а также сопредельных государств в препаратах такого рода определяются масштабами возникшей эпидемической ситуации и необходимостью создания неснижаемого запаса референс-препаратов с ежегодным обновлением.

Целью настоящей работы является разработка набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. Для достижения поставленной цели определены следующие основные задачи:

- восстановление штаммов вируса Ласса и вируса Эбола для дальнейшего использования в экспериментальных исследованиях;
- подготовка суспензионных антиген содержащих препаратов;
- получение иммунных сывороток морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценка их специфической активности в реакции непрямой иммунофлуоресценции;
- подготовка набора и испытания с референс-сыворотками.

Все исследования с зараженными вирусом Ласса и вирусом Эбола культурами клеток, а также лабораторными животными выполнены в условиях лаборатории уровня биобезопасности BSL 3–4.

Материалы и методы

В работе использовали вирус Ласса, штамм Josiah, регистрационный номер СКВБ V-I-2014-017; вирус Эбола, штамм Заир, регистрационный номер СКВБ V-I-2013-007, полу-

ченные из Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Восстановление и накопление вирусов осуществляли методом пассажей в перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6. Восстановленный вирус Ласса и вирус Эбола хранили при температуре минус 70°C и использовали для получения антигенсодержащих препаратов. Идентификацию восстановленных вирусов проводили с использованием молекулярно-генетических методов исследования — обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами на матрицах РНК, выделенных из культуральной жидкости, содержащей вирусы Ласса или Эбола. Амплификация полученных специфических кДНК-фрагментов свидетельствует о наличии РНК вирусов Ласса или Эбола в вируссодержащей жидкости и подтверждает аутентичность вирусов.

Для получения антигенсодержащих препаратов использовали монослой культур клеток Vero E6, зараженный вирусами Ласса или Эбола с множественностью инфицирования 1 БОЕ/клетка. Адсорбция вируса продолжалась 1,5 ч при температуре 37°C. В качестве поддерживающей вносили среду Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, «Sigma», США) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки коров («Sigma», США), 2 мМ L-глутамин («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). В контрольных незараженных культурах проводили лишь смену ростовой среды на среду поддержки. Через 6–7 сут культивирования монослой инфицированных и контрольных культур клеток Vero E6 дважды отмывали раствором Хенкса («Sigma», США). Культуры клеток Vero E6 снимали в 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) («Sigma», США). Полученную суспензию клеток наносили на подготовленные 8-луночные предметные стекла (ООО «Онега», РФ). Аналогично готовили препараты незараженных клеток для контрольного образца. Препараты фиксировали охлажденным при минус 20°C ацетоном в течение 20 мин и инактивировали ультрафиолетовым облучением в течение 1 ч, используя лампы Ultra Violet TUV 30w/630T8 на расстоянии 20 см от источника излучения [4]. Контроль полноты инактивации вируса в антигенных препаратах проводили методом трехкратного пассирования клеточного материала, снятого с предметных стекол в культуре клеток Vero E6, с последующим титрованием остаточной инфекционной активности вируса методом бляшек под агарозным покрытием [5]. Препараты хранили при температуре минус 20°C и применяли в качестве антигена для исследований сывороток методом непрямой иммунофлуоресценции.

Лабораторные серии иммунных сывороток получали после иммунизации морских свинок референс-штаммами вирусов Ласса и Эбола. Каждым штаммом вируса иммунизировали отдельную группу животных возрастающими дозами вируса. Первую и вторую иммунизации проводили инактивированным вирусом в дозе 10 и 100 БОЕ/животное с полным и неполным адъювантом Фрейнда («Sigma», США) соответственно с интервалом в 3–4 недели. Третью иммунизацию проводили неинактивированным вирусом в дозе 1000 БОЕ/животное, без применения адъюванта. Через 10–12 сут осуществляли тотальное кровопускание экспериментальных животных и получали сыворотки крови морских свинок по общепринятой методике.

Оценку специфической активности сывороток проводили в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Готовили двукратные разведения сывороток на растворе ФСБ, которые наносили на подготовленные антигенные препараты. Препараты помещали во влажную камеру и выдерживали 30 минут при температуре 37°C, затем промывали ФСБ и дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и наносили двукратные разведения контрольных сывороток. Препараты инкубировали в тех же условиях в течение 30 мин, промывали, высушивали. На препараты наносили соответствующие флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины (филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) в рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы. После инкубации при 37°C в течение 30 мин препараты отмывали, высушивали при комнатной температуре и просматривали в люминесцентном микроскопе. Для исследований использовали микроскоп Nikon Eclipse 80 с объективом 40х. Фотографирование исследуемых препаратов осуществляли с помощью камеры Levenhuk C510NG. Регистрацию результатов исследований проводили визуально.

В качестве референс-сывороток к вирусам Ласса и Эбола использовали сыворотки человека: сыворотка к вирусу Ласса — № 95312, титр 1:128, Институт тропической медицины, Антверпен, Бельгия; сыворотка к вирусу Эбола — № 096023, титр 1:256, Центр по контролю над инфекционными заболеваниями, Атланта, США.

Для оценки специфичности набора использовали сыворотки лиц, выздоровевших после заболевания клещевым энцефалитом, лимфоцитарным хориоменингитом, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. У всех переболевших клинический диагноз был подтвержден лабораторно.

Подготовлен набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. В состав набора входят 5 предметных стекол с антигенсодержащим препаратом культуры клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса; 5 предметных стекол с антигенсодержащим препаратом культуры клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола; сыворотка крови морской свинки, содержащая антитела к вирусу Ласса в рабочем разведении, 0,2 мл; сыворотка крови морской свинки, содержащая антитела к вирусу Эбола в рабочем разведении, 0,2 мл; конъюгат — антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые ФИТЦ в рабочем разведении, 1,5 мл; конъюгат — антитела диагностические против иммуноглобулинов морской свинки, меченые ФИТЦ в рабочем разведении, 0,5 мл; концентрат цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБ) × 25 — 20 мл и инструкция по применению.

Результаты и обсуждение

В качестве основного компонента при подготовке набора использовали суспензионные препараты антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса или вирусом Эбола и фиксированных на поверхности лунок предметных стекол, специально предназначенных для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции. С помощью набора представляется возможным определять в сыворотках крови инфицированных пациентов антитела к возбудителям лихорадки Ласса или Эбола за счет взаимодействия с иммобилизованным на предметных стеклах антигеном. По рекомендациям ВОЗ эталон-

Таблица 1. Оценка специфичности и чувствительности набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции

Сыворотка крови	Количество	ИРИФ с антителами к вирусам	
		Ласса	Эбола
Сыворотка крови человека, перенесшего ГЛПС	12	–	–
Сыворотка крови человека, перенесшего КЭ	10	–	–
Сыворотка крови человека, перенесшего ЛХМ	7	–	–
Сыворотка крови человека к вирусу Ласса (№ 95312)	1	+	–
Сыворотка крови человека к вирусу Эбола (№ 096023)	1	–	+
Сыворотка крови морской свинки к вирусу Ласса	1	+	–
Сыворотка крови морской свинки к вирусу Эбола	1	–	+

Примечание. ГЛПС — геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, КЭ — клещевой энцефалит, ЛХМ — лимфоцитарный хориоменингит.

ным диагностическим препаратом считают сыворотку крови реконвалесцента из эпидемического очага заболевания [6]. Специфичность адсорбированного антигена проверяли методом непрямой иммунофлуоресценции с референс-сыворотками. В качестве референс-сывороток к вирусам Ласса и Эбола при оценке антигенсодержащих препаратов нами использованы сыворотки крови реконвалесцентов, перечисленные в разделе материалы и методы (табл. 1). Для вирусов Ласса (рис. 1) и Эбола (рис. 2) характерна локализация специфического антигена с четкой гранулярной структурой в цитоплазме клеток. Яркое изумрудно-зеленое гранулярное свечение большинства клеток при люминесцентном микроскопировании четко просматривается на фоне темного окрашивания структуры клеток в отличие от контрольных культур (рис. 3). Подготовленные антигенные препараты содержат от 30% антигенсодержащих клеток, что является показателем их пригодности для диагностических целей. Для оценки специфичности набора исследованы сыворотки крови пациентов с подтвержденными клиническими диагнозами заболеваний клещевым энцефалитом (КЭ), геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), лимфоцитарным хориоменингитом (ЛХМ) (табл. 1).

Проведенные исследования выявили высокую чувствительность и специфическую активность разработанного диагностического набора.

Заключение

Своевременная диагностика особо опасных инфекций, вызванных вирусами Ласса и Эбола, является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий в случае завоза заболевания на территорию республики. Основным методом быстрого реагирования при выявлении геморрагических лихорадок, по-прежнему, является метод непрямой иммунофлуоресценции. С целью разработки набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции нами подготовле-

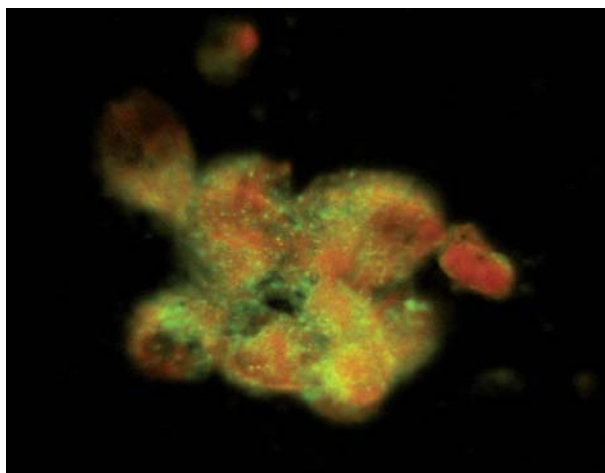


Рис. 1. Иммунофлуоресценция культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса. Увеличение $\times 400$, окраска флуоресцинизиотиоцианатом (ФИТЦ).

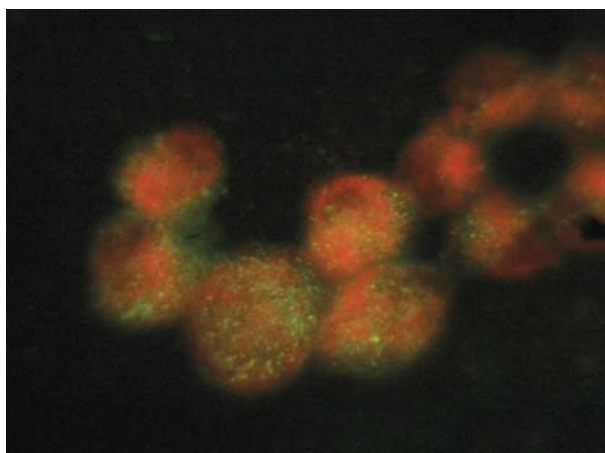


Рис. 2. Иммунофлуоресценция культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Увеличение $\times 400$, окраска флуоресцинизиотиоцианатом (ФИТЦ).

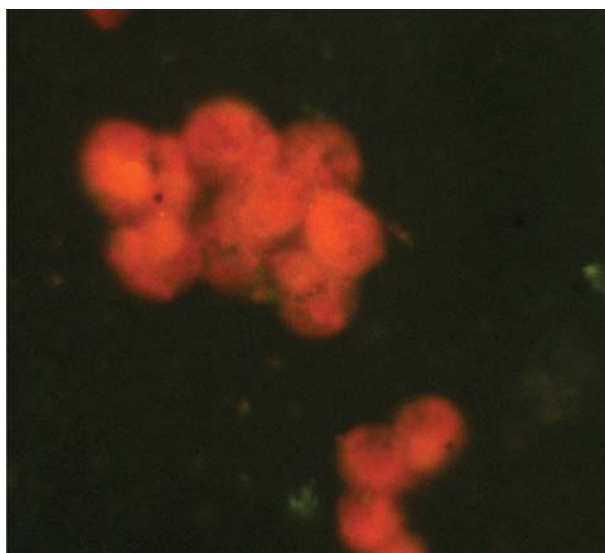


Рис. 3. Иммунофлуоресценция контрольных культур клеток Vero E6. Увеличение $\times 400$, окраска флуоресцинизиотиоцианатом (ФИТЦ).

ны суспензионные препараты антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса и антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Получены иммунные сыворотки крови морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценена их специфическая активность в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Подготовлен и зарегистрирован набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ». В связи со складывающейся эпидемиологической обстановкой по лихорадке Эбола в странах Западной Африки и необходимостью усиления настороженности в отношении возможных завозных случаев заболевания, нами разработана схема лабораторной диагностики геморрагической лихорадки Эбола с использованием набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. Набор с успехом применен на практике при обследовании лихорадящих больных, прибывших из Нигерии, Сьерра-Леоне.

Выводы

Подготовлены суспензионные препараты антигенсодержащих культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса и антигенсодержащих культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Оценена специфическая активность антигенных препаратов с использованием референс-сывороток.

Получены иммунные сыворотки крови морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценена их специфическая активность в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Об авторах

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Республика Беларусь, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23.

Рустамова Лариса Михайловна. Ведущий научный сотрудник, руководитель Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, канд. мед. наук.

Семенов Сергей Федорович. Научный сотрудник лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов.

Богданова Наталья Леонидовна. Научный сотрудник лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов.

Владыко Александр Станиславович. Заведующий лабораторией биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных вирусных инфекций, д-р мед. наук, профессор.

Красько Анатолий Геннадьевич. Заведующий лабораторией биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов, канд. мед. наук, доцент.

Адрес для переписки: Рустамова Лариса Михайловна; larisa.rustamova@gmail.com

Подготовлен и зарегистрирован набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ», который применен для обследования лихорадящих больных, прибывших в Республику Беларусь из стран Западной Африки (Нигерии, Сьерра-Леоне).

Литература

1. *Заявление ВОЗ по итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении вспышки Эболы 2014 г. в Западной Африке.* Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/ru/>.
2. Красько АГ, Рустамова ЛМ, Счесленок ЕП, Семизон ПА, Владыко АС, Горбунов ВА. Диагностика и профилактика особо опасных вирусных инфекций в Республике Беларусь. В кн.: *Материалы XII Межгосударственной научно-практической конференции, Саратов, 25–26 ноября 2014 г. Саратов; 2014. С. 123.*
3. Frame ID, Verbrugge GP, Gill RG, Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyd.* 1984; 78: 319–24.
4. Трофимов НМ, Климашевская ЛМ, Ерофеева НИ. Влияние некоторых физико-химических факторов на аренавирусы. *Вопросы вирусологии* 1981; (2): 240–2.
5. Устинова ЕН, Шестопалов АМ, Бакулина ЛФ, Чепурнов АА. Титрование вируса Эбола и Марбург по бляшкообразованию под полужидким агаровым покрытием. *Вопросы вирусологии* 2003; (1): 43–4.
6. Маркин ВА. Методология коллекционирования патогенов. *Вопросы вирусологии* 2010; (5): 4–9.

The kit for identification of antibodies against Lassa and Ebola viruses by indirect immunofluorescence

L. M. Rustamova, S. F. Semenov, N. L. Bogdanova, A. S. Vladiko, A. G. Krasko

Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

Timely diagnosis of particularly dangerous infections caused by viruses Ebola and Lassa is crucial in organization of anti-epidemic measures in the case of important of the disease on the territory of the Republic of Belarus. The main method of rapid response at revealing hemorrhagic fevers Lassa and Ebola still is the method of indirect immunofluorescence. In this work the elaboration of the kit for detection of antibodies to excitors of extremely dangerous viral infection Lassa and Ebola by indirect immunofluorescence method is described.

Key words: extremely dangerous viral infections; arenaviruses; Lassa virus; filoviruses; Ebola virus; antibody, the method of indirect immunofluorescence.

For citation: Rustamova LM, Semenov SF, Bogdanova NL, Vladiko AS, Krasko AG. The kit for identification of antibodies against Lassa and Ebola viruses by indirect immunofluorescence. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 115–119.

References

1. WHO statement after the meeting of the Committee of the International Health Regulations Emergency in relation to outbreaks of Ebola in 2014 in West Africa. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/ru/> (in Russian).
2. Krasko AG, Rustamova LM, Scheslenok EP, Semizhon PA, Vladyko AS, Gorbunov VA. Diagnosis and prevention of dangerous viral infections in the Republic of Belarus. In: Proceedings of the XII Inter-State scientific-practical conference, Saratov, 25–26 November 2014. Saratov; 2014. P. 123 (in Russian).
3. Frame ID, Verbrugge GP, Gill RG, Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyd.* 1984; 78: 319–24.
4. Trofimov NM, Klimashevskaya LM, Erofeeva NI. The influence of some physical and chemical factors on arenaviruses. *Voprosy virusologii* 1981; (2): 240–2 (in Russian).
5. Ustinova EN, Shestopalov AM, Bakulina LF, Chepurnov AA. Titration of the Ebola virus and Marburg on the plaque under the semi-liquid agar surface. *Voprosy virusologii* 2003; (1): 43–4 (in Russian).
6. Markin VA. The methodology of collecting pathogens. *Voprosy virusologii* 2010; (5): 4–9 (in Russian).

Authors

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Republic of Belarus, 23 Filimonova Street, Minsk, 220114, Republic of Belarus.

Rustamova LM. Leading researcher, head of Specialized collection of viruses and bacteria, pathogenic for humans. Candidate of Medical Sciences.

Semenov SF. Researcher of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens.

Bogdanova NL. Researcher of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens.

Vladyko AS. Head of Laboratory of biotechnology and immunodiagnostics of especially dangerous virus infections. Doctor of Medical Sciences, professor.

Krasko AG. Head of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens. Candidate of Medical Sciences, docent.