

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЕРИФИКАЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия

На основании экспериментальных исследований при 10-кратных разведениях двух разных по молекулярно-генетической характеристике штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа получены комплексные данные одновременного учета трех показателей их верификации (титра вируса, ИФА и ПЦР-РВ). Эффективность выявления генетического маркера в ПЦР по сравнению с ИФА для слабопатогенного штамма, имеющего дефекты в генетической структуре, была выше в 10 раз, а для высокопатогенного штамма – в 5000 раз. Одновременно положительные результаты в обеих реакциях относительно двух штаммов выявляли при титре вируса не менее, чем  $1-1,5 \log TCID_{50}$ , т.е. этот уровень вируса в пробе определен как эпидемически значимый. Предложен алгоритм проведения исследований по верификации ВКЭ: 1. Клещи, собранные с растительности, могут быть исследованы в ИФА или в ПЦР. Все положительные результаты можно суммировать и считать вирусофорностью ископаемых клещей; 2. Все пробы с положительными результатами только в ПЦР или ИФА необходимо исследовать в двух реакциях, чтобы получить подтверждение возможной инфекционности возбудителя; 3. Для получения быстрого комплексного результата зараженности снятых клещей с пациентов или крови после укуса клеща исследования необходимо проводить сразу одновременно в двух реакциях в ИФА и ПЦР; 4. Выделение вируса проводить в биологических пробах (клещи, собранные с растительности, клещи, снятые с пациентов, кровь больных и с подозрением на КЭ, млекопитающие) только при совпадающих результатах в ПЦР и ИФА. Таким образом, такой подход к верификации вируса КЭ в клеще или в крови пациентов позволит улучшить достоверность лабораторной диагностики, выявляя не только маркеры ВКЭ, но и предопределяя инфекционность возбудителя, что может явиться основанием для назначения ранней интенсивной противовирусной терапии.

Ключевые слова: ИФА; ПЦР-РВ; концентрация (титр) высоко- и низко- патогенных штаммов вируса КЭ.

Для цитирования: Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 686-689. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>

Leonova G.N.

### COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS EFFICIENCY OF VIRIFICATION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITE VIRUS

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

Based on experimental studies with 10-fold dilutions of two the strains TBEV of the Far Eastern subtype, different in molecular-genetic characteristic complex data of simultaneously taking into account three indicators of their verification (virus titer, ELISA and PCR-RT) were obtained. The efficiency of detecting a genetic marker in PCR compared with ELISA for a weakly pathogenic strain with defects in the genetic structure was higher by a factor of 10, and for a highly pathogenic strain by a factor of 5,000. At the same time, positive results in both reactions with respect to two strains were detected with a virus titer of not less than  $1-1.5 \log TCID_{50}$ , i.e. this level of virus in the sample is defined as epidemically significant. An algorithm for conducting research on the verification of TBEV is proposed: 1) Ticks collected from vegetation can be examined by ELISA or by PCR. All positive results can be summarized and considered viral ticks; 2) All samples with positive results only in PCR or ELISA must be investigated in two reactions in order to obtain confirmation of the possible infectivity of the pathogen; 3) To obtain a fast complex result of infection of the removed ticks from patients or blood after a tick bite, studies should be carried out simultaneously in two reactions simultaneously in ELISA and PCR; 4) Isolation virus should be carried out in biological samples (ticks collected from vegetation, ticks removed from patients, the blood of patients with suspected TBE, mammals) only with the same results in PCR and ELISA.

Thus, such an approach to verifying TBEV in a tick or in the blood of patients will improve the reliability of laboratory diagnostics, identifying not only markers of TBEV, but also determining the infectivity of the pathogen, which may be the basis for the appointment of early intensive antiviral therapy.

Key words: ELISA; PCR-RT; concentration (titer) of high and low pathogenic strains of TBEV.

For citation: Leonova G.N. Comparative analysis of methods efficiency of virification of the tick-borne encephalite virus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (11): 686-689. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>

For correspondence: Galina N. Leonova, Chief Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Doctor of Medical Sciences, Professor, e-mail: [galinaleon41@gmail.com](mailto:galinaleon41@gmail.com)

#### Information about authors:

Leonova G.N. <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 14.06.2019  
Accepted 19.06.2019

**Введение.** В последние годы отмечен значительный успех в диагностике клещевых инфекций на территории Российской Федерации. Если в 1990-2000-х годах основным методом диагностики клещевого энцефалита (КЭ) был иммуноферментный анализ (ИФА) [1,2], то в последнее десятилетие прочно внедрились методы молекулярной диагностики, которые повышают эффективность диагностических и профилактических мероприятий, совершенствуют проведение эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями [3,4]. Именно эти оба метода являются основными при изучении вирусофорности иксодовых клещей, а также диагностики КЭ. Однако в научно-практической работе при использовании этих методов исследователи зачастую сталкиваются с несопадением полученных результатов [5]. Кроме того, положительные пробы клещей и крови пациентов, выявленные в ИФА или в ПЦР, зачастую не подтверждаются изоляцией вируса КЭ. Однако на основании этих результатов пациентам назначают специфический иммуноглобулин, обосновывая эпидемиологическую и экономическую эффективность профилактики КЭ [2,6].

**Цель настоящего исследования:** на основании экспериментальных данных по верификации вируса КЭ провести сравнительный анализ эффективности методов диагностики ПЦР, ИФА и определения концентрации (титра) возбудителя в исследуемой пробе.

**Материал и методы.** Для проведения экспериментальных исследований использовали два штамма ВКЭ. Штамм Dal'negorsk (Dal') выделен из мозга пациента, умершего от КЭ. Штамм Prigoeye-437 выделен из крови здорового человека после присасывания клеща. По биологическим свойствам штамм Dal' был охарактеризован как высоковирулентный, а штамм P-437 – как слабовирулентный [7], по данным полногеномного секвенирования штамм Dal' (FJ402886, GeneBank) – как типичный представитель Sofjin-подобных, а P-437 (JQ825162, GeneBank) – Oshima-подобных штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа [8].

Для исследования экспериментальных проб методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали набор реагентов «АмплиСенс® TBEV-Fl» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) согласно инструкциям производителя на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия).

Выявление антигена ВКЭ в пробах проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностического набора «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск) согласно инструкции производителя тест-системы. Образец считали положительным при коэффициенте (К) оптической плотности  $\geq 1.0$ . Коэффициент позитивности определяли по формуле:  $K = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{критического значения}} / \frac{ОП_{образца}}{ОП_{критического значения}}$  при  $ОП_{образца} \geq 0,2 \cdot (ОП_{критического значения} - ОП_{средняя})$  (ОП – оптическая плотность,  $K^+$  – отрицательный контроль).

Титр вируса определяли путем 10-кратного титрования его от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  по цитопатическому действию клеток СПЭВ, зараженных каждым разведением обоих штаммов и выражали в  $\log TCID_{50}/ml$ .

Экспериментальные исследования проведены в трех повторах.

**Результаты.** Для получения сравнительных данных в эксперименте использована одинаковая концентрация исходного инфекционного вируса штаммов Dal' и

P-437 ВКЭ, титр которых составлял  $3,5 \log TCID_{50}/ml$ . При проведении комплексной диагностики на модели этих штаммов, различающихся по биологической и молекулярно-генетической характеристике, установлены как сходства, так и различия в полученных результатах.

По данным ИФА, для слабовирулентного штамма P-437 положительные результаты зарегистрированы начиная с титра вируса  $1,5 \log TCID_{50}/ml$  (при разведении  $10^{-3}$  и выше), по данным ПЦР – при титре вируса  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  (при разведении  $10^{-4}$  и выше). Показатели были отрицательными в обеих реакциях при разведении штамма  $10^{-5}$ , что свидетельствовало о полном отсутствии вируса в этой пробе (см. рисунок).

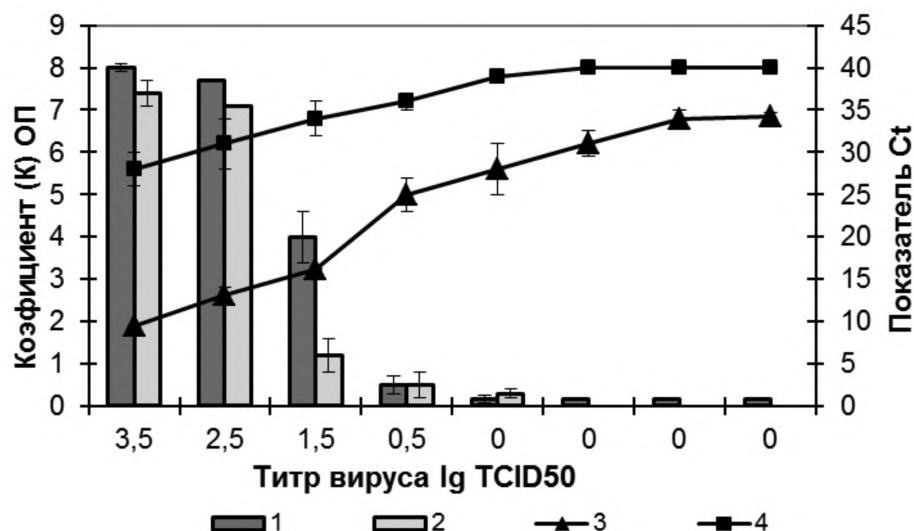
Для высоковирулентного штамма Dal' схожесть результатов со штаммом P-437 заключалась в том, что при титрах вируса ниже  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  результаты в ИФА были отрицательными. Причем, в ПЦР все показатели St у высоковирулентного штамма были значительно выше по сравнению с St-показателями штамма P-437. Положительные ПЦР-результаты зарегистрированы не только в пробе с титром  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  ( $St = 25 \pm 2$ ), но и в дальнейших разведениях штамма при постепенном снижении показателей генетического маркера St ( $10^{-5} - 28 \pm 3$ ;  $10^{-6} - 31 \pm 1,5$ ;  $10^{-7} - 34 \pm 1$ ;  $10^{-8} - 34,2 \pm 0,5$ ).

Таким образом, на рисунке видно, что одновременно положительные результаты в обеих реакциях у двух штаммов выявляли при титре вируса не менее, чем  $1-1,5 \log TCID_{50}$ , т.е. этот уровень вируса в пробе можно считать уже эпидемически значимым.

**Обсуждение.** В эксперименте при 10-кратных разведениях ВКЭ получены данные комплексных исследований с одновременным учетом трех показателей (титра вируса, ИФА и ПЦР-РВ). Важно было объяснить, почему результаты ИФА и ПЦР не совпадают, и какие действия следует предпринимать в таких случаях. Выявление положительных результатов в иксодовых клещах только в ИФА отражает присутствие антигена оболочечного E-белка ВКЭ, который зачастую представлен неполноценными или дефектными вирусными частицами, формирующимися в процессе сложного морфогенеза иксодовых клещей, получивших вирус по наследству трансфазовым или трансмиссивным путем. Другие результаты получаются при использовании разработанного сотрудниками ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ метода ПЦР-РВ с субтип-специфическими флуоресцентными зондами, при котором конкретной мишенью для праймеров и зондов являлся участок РНК гена NS1 [3].

Получены неоспоримые результаты высокой перспективности ПЦР-РВ для индикации генетического маркера ВКЭ. Расхождение фактов выявления положительных показателей диагностических маркеров в ПЦР по сравнению с ИФА отмечено для слабопатогенного штамма P-437 в диапазоне титра вируса, равного  $1 \log TCID_{50}/ml$ , для высоко патогенного штамма Dal'negorsk –  $5 \log TCID_{50}/ml$ . То есть эффективность выявления генетического маркера в ПЦР по сравнению с ИФА для слабопатогенного штамма, имеющего дефекты в генетической структуре, была выше в 10 раз, а для высокопатогенного штамма – в 5000 и более раз.

Ранее нами было показано, что штамм P-437 имеет 24 замены аминокислот относительно штамма Dal'negorsk: Q32R, K64N, K69R, D100N and L111Del в капсидном белке; I130V, V137A, A151V в ргМ; A431T, V463A в белке E; S141G в NS1; K52R, T168I в NS2A; F108V в NS2B;



Сравнительные данные комплексной диагностики разных по биологическим характеристикам штаммов Dal'negorsk и Primore-437 вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа.

По оси абсцисс - титр вируса (lg TCID<sub>50</sub>/мл) при разведениях штаммов от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>.

1 - штамм Dal'negorsk, 2 - штамм Primore-437 (данные ИФА),

3 - штамм Dal'negorsk, 4 - штамм Primore-437 (данные ПЦР).

R16K, S45S, S261A в NS3; M95V, V179A, A213V в NS4B; S634T, R677K, I692V, A724S в NS5 [8]. Кроме того, установлено, что замены аминокислот в неструктурных вирусных белках таких, как протеаза (комплекс белков NS2B/NS3) и РНК полимеразы могут влиять на активность ферментов и на скорость размножения вируса КЭ [9]. Эти данные свидетельствуют о том, что верификация штаммов ВКЭ с разной биологической характеристикой в ПЦР может происходить по-разному.

Выявление в ПЦР положительного результата в клеще обозначает только то, что обнаружен участок гена NS1 – маркера вируса КЭ. Чтобы знать произойдет ли заражение пациента вирусом, способным вызвать заболевание человека или лабораторных животных, считаем необходимым иметь одновременно два положительных результата: не только в ПЦР, но и в ИФА, при котором выявляется другой участок гена РНК – антиген Е-белка. Сочетание этих двух показателей указывает на выявление вируса, концентрация которого может обеспечить его активную репликацию. Становится понятным, почему зачастую невозможно выделить инфекционный вирус в случаях выявления только одного фрагмента вирусного генома или в ПЦР, или в ИФА. Изучение вируссофорности иксодовых клещей в той или иной реакции может показать, что иксодовый клещ содержит какой-то фрагмент вирусного генома, отражающий участие этого членистоногого в циркуляции вирусной популяции на определенной территории природного очага. Выделить полноценный инфекционный вирус, реально представляющий опасность, возможно только при совпадении вышеуказанных параметров (положительных результатов в ИФА и ПЦР при количестве вируса более чем 1 log TCID<sub>50</sub>/мл).

Как правило, во всех лабораториях страны верификация ВКЭ в клещах или у пациентов проводится в одной реакции или в ИФА, или в ПЦР. Так, в 2017 г. в клещах, снятых с пациентов на территории Приморского края,

число положительных маркеров в ИФА составило 3%, в ПЦР – 1,1%, в 2018 г. – 0,5% и 0,6%, соответственно [10-12]. При этом средний показатель К оптической плотности проб в ИФА был равен 1,5, максимальный показатель – К=4,1. В ПЦР средний показатель Ct составил 30,9, максимальный – Ct=25,4. В то же время, в клещах, собранных с растительности, наряду с низким процентом инфицированности иксодовых клещей ВКЭ, средний показатель Ct=26,7, максимальный – Ct=20,4. Только по этим довольно высоким показателям Ct нельзя определить инфекционность РНК-изолята, о чем свидетельствуют представленные выше результаты экспериментальных исследований (см. рисунок).

Такие результаты мы наблюдали при исследованиях одновременно в двух реакциях 8-ми иксодовых клещей, ни одного совпадения положительных результатов в обеих реакциях не было зарегистрировано. Больше того, эти пробы с положительными результатами в ИФА или в ПЦР были исследованы вирусологическим методом на модели 2-х сут белых мышей. Ни в одном случае выделить вирус КЭ не удалось, что могло свидетельствовать об отсутствии инфекционного возбудителя в исследуемых образцах иксодовых клещей. Прямым дополнительным доказательством тому, что в последние годы в природных очагах на фоне низкой вируссофорности клещей резко снизилась эпидемическая напряженность в отношении КЭ, явился низкий уровень заболеваемости КЭ населения Приморского края (в 2015 г – 1,2; 2016 г – 1,37; 2017 г – 1,4; 2018 г – 0,43 на 100 тыс. населения).

**Заключение.** На основании экспериментальных данных и данных изучения зараженности иксодовых клещей алгоритм проведения исследований по верификации ВКЭ можно определить следующим образом:

1. Клещи, собранные с растительности, могут быть исследованы в ИФА или в ПЦР. Все положительные ре-

зультаты можно суммировать и считать вирусофорностью иксодовых клещей;

2. Все пробы с положительными результатами только в ПЦР или ИФА необходимо исследовать в двух реакциях, чтобы получить подтверждение возможной инфекционности возбудителя;

3. Для получения быстрого комплексного результата зараженности снятых клещей с пациентов или крови после укуса клеща исследования необходимо проводить сразу одновременно в двух реакциях в ИФА и ПЦР;

4. Выделение вируса проводить в биологических пробах (клещи, собранные с растительности, клещи, снятые с пациентов, кровь больных и с подозрением на КЭ, млекопитающие) только при совпадающих результатах в ПЦР и ИФА.

Таким образом, предлагаемый экспериментально обоснованный подход к верификации вируса КЭ в клеще или в крови пациентов позволит улучшить достоверность специфической лабораторной диагностики, выявляя не только маркеры ВКЭ, но и предопределяя инфекционность возбудителя. Это послужит бесспорным основанием для назначения ранней интенсивной противовирусной терапии.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа поддержана научным проектом (0545-2019-0007) Федерального Государственного бюджетного научного учреждения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мельникова О.В., Ботвинкин А.Д., Данчинова Г.А. Сравнительные данные о зараженности вирусом клещевого энцефалита голодных и питающихся таежных клещей (по результатам иммуноферментного анализа). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1997; 1: 44–9.
2. Козлова И.В., Злобин В.И., Воробьева М.С., Верхозина М.М. Экспресс-диагностика и экстренная профилактика иксодовых клещевых инфекций. М: ООО «Компания Боргес»; 2009.
3. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г., Левина Л. С., Пиванова Г. П., Колясникова Н. М., Гамов, Е. Г., Трухина А. Г., Злобин В. И., Верхозина М. М., Джиоев Ю. П., Демина Т. В., Погодина В. В. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита. *Бюллетень СО РАМН*. 2007; 4(126): 34-40.
4. Вергинина Е.В., Симонова Е.Г., Паксина Н.Д. Эпидемиологический мониторинг инфекций, передающихся клещами в 2013-2017 гг. *Медицинская вирусология*. Тезисы Российской научной конференции. 2017; XXXI (1): 13.
5. Мельникова О. В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229–35.
6. Пенъевская Н.А. Оценка эффективности этиотропной профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами: проблемы теории и практики. Омск: Издательский центр «Омский научный вестник»; 2010.
7. Леонова Г.Н. Особенности биологической характеристики двух разных по патогенности дальневосточных штаммов вируса клещевого энцефалита. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 3: 17-20.
8. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephali-

- tis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS One*. 2014; Apr 16; 9(4):e94946.
9. Potapova U.V., Feranchuk S.I., Potapov V.V., Kulakova N.V., Kondratov I.G., Leonova G.N., Belikov S.I. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012; 30: 638–51.
10. Лубова В.А., Берлизова М.В., Курловская А.В., Бондаренко Е.И., Леонова Г.Н. Лабораторная диагностика трансмиссивных клещевых инфекций в Приморском крае. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018; 1 (73):13-20.
11. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Иванис В.А. Мониторинг возбудителей клещевых инфекций на территории Приморского края в период 2014-2018 гг. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; 4: 10-4.
12. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Эпизоотологическая ситуация по клещевым инфекциям в 2018 году на юге Дальнего Востока. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; 77. 1: 11-8.

#### REFERENCES

1. Mel'nikova O.V., Botvinkin A.D., Danchinova G.A. Comparative data on tick-borne encephalitis virus infection of hungry and fed taiga ticks (based on enzyme immunoassay). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1997; 1: 44–9. (in Russian)
2. Kozlova I.V., Zlobin V.I., Vorob'jova M.S., Verhozina M.M. Rapid diagnosis and emergency prophylaxis of Ixodes tick-borne infections, section "Antibodies and test kits for prevention and diagnosis of tick-borne encephalitis. Moscow: Companiya Borges; 2009. (in Russian)
3. Karan L.S., Malenko G.V., Bochkova N.G., Levin L.S., Pivanova G. P., Kolyasnikova N.M., Gamov, E.G., Trukhina A.G., Zlobin V.I., Verkhovina M.M., Dzhioev Yu.P., Demina T.V., Pogodina V.V. The use of molecular genetic techniques to study the structure of tick-borne encephalitis virus strains. *Bulleten' SO RAMN*. 2007; 4(126): 34-40. (in Russian)
4. Verginina E.V., Simonova E.G., Paksina N.D. Epidemiological monitoring of tick-borne diseases in Russia during 2013-2017. *Tezisy Rossiyskoy nauchnoy konferentsii*. *Meditsinskaya virusologiya* 2017; XXXI (1): 13. (in Russian)
5. Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis Virus isolates from natural foci of the Irkutsk region: clarification of the genotype landscape. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(5): 229–35. (in Russian)
6. Pen'evskaya N.A. Evaluation of the etiotropic prevention of infections transmitted by ixodid ticks: problems of theory and practice. Омск: Омский научный вестник; 2010. (in Russian)
7. Leonova G.N. Biological characteristics of two far eastern tick-borne encephalitis virus strains of different pathogenicity. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2017; 3: 17-20. (in Russian)
8. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS One*. 2014. Apr 16; 9(4):e94946.
9. Potapova U.V., Feranchuk S.I., Potapov V.V., Kulakova N.V., Kondratov I.G., Leonova G.N., Belikov S.I. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012; 30: 638–51.
10. Lubova V.A., Berlizova M.V., Kurlovskaya A.V., Bondarenko E.I., Leonova G.N. Laboratory diagnosis of tick-borne infections in Primorsky Krai. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya*. 2018; 1 (73): 13-20. (in Russian)
11. Leonova G.N., Lubova V.A., Ivanis V.A. Monitoring tick-borne pathogens in the Primorsky Territory in the period 2014-2018. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 4: 10-4. (in Russian)
12. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Epizootological situation on tick-borne infections in 2018 in the south of the Far East. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2019; 77. 1:11-8. (in Russian)

Поступила 14.06.19

Принята к печати 19.06.19