

В результате проведенных исследований показано, что применение сочетанных методов детекции возбудителя ВГА позволило обнаружить инфекционный агент в биологическом материале и объектов окружающей среды, который не удавалось обнаружить без селективного концентрирования проб на МИС (рис. 3). Это дало возможность выявить источник инфекции, своевременно его локализовать, провести эпидемиологическое исследование и определить водный характер вспышки ВГА. На основании полученных данных были оперативно приняты оптимальные решения и реализованы конкретные противоэпидемические мероприятия.

Таким образом, показано, что применение магнитоиммуносорбентов в сочетании с экспрессными методами диагностики (ИФА и ПЦР) повышает чувствительность этих методов, одновременно сокращая время проведения исследований за счет ускорения манипуляций и исключения ряда этапов в ходе анализов, что позволяет повысить эффективность противоэпидемических мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блохина Н.П. // Матер. VI Рос. съезда врачей-инфекционистов. – СПб, 2003. – С. 38–39. – 2. Жарникова И.В. Разработка технологии композиционных магнитоиммуносорбентов и конструирование на их основе диагностических тест-систем для иммуноанализа возбудителей чумы и туляремии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 1995. – 24 с. – 3. Камина Т.В., Русанова А.К., Иванова Т.Г. и др. // Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее: Тр. конф. – СПб, 2001. – С. 109–110. – 4. Каретный Ю.В., Каганов Б.С., Добротворский И.Л. // Вопр. совр. педиатрии. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 83–92. –

5. Корсуков В.Н., Гаранина С.Б., Куличенко А.Н. и др. // Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образования противочум. службы России. – Саратов, 1997. – Т. 2. – С. 186. – 6. Платонов А.Е., Карань Л.С., Родионова Е.Н. и др. // Совр. технол. в диагн. особо опасных инф. бол.: Матер. 4-й Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. – Саратов, 2003. – С. 144–146. – 7. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В. Вирусные гепатиты от А до ТTV у детей. – М.: Новая волна, 2003. – 432 с. – 8. Филиппов Н.И., Тихвинский М.С., Воробьев А.А. и др. // Диагн., лечение и профилактика опасных инф. забол. Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. науч. конф., посв. 70-летию НИИ микробиол. МО РФ. – Киров, 1998. – С. 244. – 9. Фримель Г. (Friemel H.). Иммунологические методы / Пер. с нем. – М., 1987. – С. 390–395. – 10. Karan L.S., Sannikova I.V., Platonov A.E. et al. // Int. Conf. on Emerging Infect. Dis. – Atlanta, 2004. – P. 125. – 11. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. – 1974. – Vol. 22, N 4. – P. 1084–1091.

N.F. Vasilenko, S.N. Stepanova, V.I. Yefremenko, E.N. Afanasyev,
E.I. Yermenko, O.I. Tsygankova

The Use of Combined Express Methods of Diagnosis to Detect Hepatitis A Virus

Stavropol Anti-Plague Research Institute, Stavropol State Medical Academy

Combined methods of express-diagnosis of viral hepatitis A based on selective concentration of the virus on the surface of magnet immune sorbents (MIS) followed by immuno-enzyme analysis (IEA) and polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) tests were developed by the authors. Application of MIS in combination with the express-diagnosis methods (IEA and PCR) was shown to increase the sensitivity of the methods in parallel with reducing the time of the experiments due to introducing more rapid manipulations and elimination of some stages of the analysis, thus enhancing the efficacy of the anti-epidemic measures.

Key words: hepatitis A, antigen, viral RNA, immuno-enzyme analysis, polymerase chain reaction, magnet immune sorbents, combined method.

Поступила 21.07.05.

УДК 616.24-022-022:616.9:616.07

Г.Л.Карбышев¹, А.Н.Терентьев¹, Е.В.Безуглова¹, И.Р.Симонова¹, А.П.Кочеткова¹,
В.Я.Склярская², А.А.Матер³

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА.

Сообщение 2. Испытания легионеллезного серогруппы 1
антигенного полимерного диагностикума для реакции объемной аггломерации
в практике лабораторной диагностики пневмоний

¹Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт,
²Городской пульмонологический центр, ³Областная клиническая больница, Ростов-на-Дону

В работе обобщены результаты использования реакции объемной аггломерации с диагностикумом легионеллезным серогруппы 1 антигенным полимерным для диагностики заболеваний органов дыхания в пульмонологических стационарах за период с 1997 по 2004 год. Проведен сравнительный анализ трех методов диагностики: реакции непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментного метода и реакции объемной аггломерации. Показано, что разработанный в Ростовском НИПЧИ диагностический препарат для РАО является надежным серологическим методом подтверждения клинического диагноза легионеллеза.

Ключевые слова: легионеллез, диагностикум.

Первые случаи заболевания легионеллезом в Ростове-на-Дону были выявлены в 1990 г. [3]. По данным литературы, частота выявления случаев легионеллеза среди больных пневмонией колеблется

от 10,7 до 12,2 % [4, 5, 6, 7]. При обследовании здорового населения пределы таких колебаний значительно шире и связаны как с тактикой эпидемиологического надзора (активный или пассивный), так и

с выбором группы лиц с повышенным риском заражения. Так, частота спорадического легионеллеза среди населения в целом, по данным пассивного эпиднадзора в США, составляет 0,2, а по данным активного выявления – 12 на 100000 населения [6]. При сероэпидемиологическом исследовании в группах риска частота положительных серологических результатов колеблется от 1 до 55,4 % [1, 2].

Ростовским НИПЧИ разработан диагностический препарат легионеллезный серогруппы 1 антигенный полимерный для реакции объемной агломерации [3]. Однако сообщений о результатах его использования еще недостаточно.

Целью настоящих исследований явилось сравнительное изучение трех серологических реакций (РАО, ИФА, РНИФ) в диагностике легионеллеза.

За период 1997–2004 гг. всего исследовано 598 сывороток крови от 509 больных острыми пневмониями, госпитализированных в медицинские учреждения Ростова-на-Дону.

Распределение больных по возрастам было следующим: до 20 лет – 8,3 %, 21–30 лет – 9,4 %, 31–40 лет – 20,8 %, 41–50 лет – 17,4 %, 51–60 лет – 21,0 %, 60 и выше – 23,1 %. У всех больных установлен диагноз острой пневмонии с различными вариантами клинического течения: бронхопневмония, очаговая, плевропневмония, крупозная. Правосторонняя локализация воспалительного процесса имела место у 61,5 % больных, левосторонняя – у 33,8 % и 2-сторонняя – у 4,7 %. Локализация воспалительного процесса в верхней доле имела место у 15,7 % больных, в нижней доле – у 78,4 %, в средней в правом легком – у 5,9 %. Осложненное течение заболевания регистрировалось у 15,5 % больных. Виды осложнений были следующие: дыхательная недостаточность – 14,7 % больных, абсцедирование в области воспалительного процесса – 3,5 %, симптомы легочного кровотечения – 4,9 %, развитие экссудативного плеврита – 7 % больных.

Для серологической диагностики легионеллеза были использованы три метода: реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), реакция агломерации объемной (РАО).

Реакция непрямой иммунофлюоресценции. В настоящее время является серологическим методом, утвержденным ВОЗ для целей международной регистрации заболеваемости. Постановку реакции осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями «Эпидемиология, клиника, лечение и профилактика легионеллеза» (М., 1988) и «Методические рекомендации по лабораторной диагностике легионеллеза» (М., 1987), а в соответствии с Меморандумом ВОЗ за диагностический титр принимали разведение сыворотки от 1:64 и выше. Был использован коммерческий набор производства НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, состоящий из стандартного коммерческого корпускулярного антигена и контрольной кроличьей легионеллезной сыворотки. Всего в РНИФ исследовано 458 сывороток, положительные результаты выявлены в 12,7 % случаев.

Иммуноферментный анализ. Постановка производилась в соответствии с методическими рекомендациями «Эпидемиология, клиника, лечение и профилактика легионеллеза» (М., 1988) и «Методи-

ческие рекомендации по лабораторной диагностике легионеллеза» (М., 1987) с использованием коммерческих препаратов – «Антиген *Legionella pneumophila* серогруппы 1 для ИФА» и «Иммуноглобулины диагностические против Ig G (H+L) человека, меченные пероксидазой, сухие» производства НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи. За диагностический принимали титр сыворотки 1:400. Всего в ИФА исследовано 468 сывороток, положительные результаты выявлены в 23,1 % случаев.

Реакция объемной агломерации (РАО). Для проведения реакции использован разработанный в Ростовском-на-Дону противочумном институте диагностиком легионеллезный антигенный полимерный сухой, который не имеет ни отечественных, ни зарубежных аналогов. Исследования по изучению чувствительности и специфичности препарата, а также клинические его испытания позволили установить диагностический титр – 1:80. Всего в РАО исследовано 509 сывороток, положительные результаты выявлены в 9,2 % случаев.

Сравнительный анализ результатов РНИФ, ИФА и РАО представлен в таблице.

Результаты сравнительного исследования серологических методов выявления специфических антилегионеллезных антител

Метод (диагностический титр)	Частота положительных результатов, %	С подтверждением другими методами, %	Нарастание титров, %	Без нарастания титров, %
РНИФ (титр 1:62), n=458	12,7 (n=58)	ИФА (титр 1:400) 25,9 (n=15) РАО (титр 1:80) 37,9 (n=22) ИФА (1:400), РАО (1:80) 20,7 (n=12) ИФА (отр.), РАО (отр.) 15,5 (n=9)	21,1	36,8
ИФА (титр 1:400), n=468	23,1 (n=108)	РНИФ (титр 1:62) 13,9 (n=15) РАО (титр 1:80) 11,1 (n=12) РНИФ (1:62), РАО (1:80) 11,1 (n=12) РНИФ (отр.), РАО (отр.) 63,9 (n=69)	33,3	33,3
РАО (титр 1:80), n=509	9,2 (n=47)	РНИФ (титр 1:62) 38,3 (n=18) ИФА (титр 1:400) 23,4 (n=11) РНИФ (1:62), ИФА (1:400) 25,5 (n=12) РНИФ (отр.), ИФА (отр.) 12,8 (n=6)	35,3	17,7

Примечание. n – кол-во пациентов.

При использовании РНИФ, ИФА и РАО положительные результаты получены с частотой 12,7, 21,3 и 9,2 % соответственно. Несмотря на то, что наиболее высокая частота положительных результатов отмечена при использовании метода ИФА – 21,3 %, именно ИФА давал наибольшее число положительных результатов, не подтверждаемых другими методами – 63,9 %. Это может свидетельствовать о регистрации ложноположительных результатов, определяемых этим методом. Частота совпадений положительных результатов ИФА с РНИФ составила 13,9 %, а с РАО – 11,1 %.

Разработанный нами диагностиком для РАО обладал высокой чувствительностью и специфично-

стью. Наиболее высокая частота совпадений положительных результатов РАО отмечена при использовании метода РНИФ – 38,3 %.

Исследование сывороток больных методом РНИФ, предлагаемым ВОЗ для целей международной регистрации легионеллеза, показало, что частота положительных результатов, подтверждаемых другими методами, составила 20,7 %, наиболее высокий процент совпадения положительных результатов отмечен с РАО – 37,9.

При повторном исследовании сывороток крови больных в стадии выздоровления отмечено, что при использовании метода РАО определяется наиболее высокая частота нарастания титров – 35,3 % и наименьшая частота неизмененных титров – 17,7 %, в то время как для РНИФ частота нарастания титров в парных сыворотках составила только 21,1 %.

Таким образом, анализ различных методов выявления антител к *Legionella pneumophila* серогруппы 1 показал, что в сравнении со стандартным общепризнанным методом диагностики легионеллеза (РНИФ), утвержденным для целей международной регистрации заболеваемости, метод РАО оказался не только сопоставим с РНИФ, но и превысил его по частоте нарастания титров в динамике инфекционного процесса, что свидетельствует о возможности и необходимости его применения в практике диагностики легионеллеза.

Метод ИФА, рекомендуемый для целей диагностики легионеллеза в России, в соответствии с полученными нами данными оказался недостаточно специфичным, поскольку давал высокую частоту положительных результатов, не подтверждаемых другими методами серологического исследования (63,9 %). Это свидетельствует о возможности получения в ИФА ложноположительных результатов, что позволяет рекомендовать использование ИФА только в сочетании с одним из двух других методов исследования (РНИФ или РАО). В то же время РНИФ и РАО могут быть использованы в качестве единственного метода серологической диагностики легионеллеза.

В результате проведенных исследований разработаны следующие критерии серологической диагностики легионеллеза:

Предварительный ответ выдается:

при обнаружении антител в диагностических титрах в одном из двух методов исследования: РНИФ (титр 1:62) или РАО (титр 1:80) с рекомендациями повторного исследования крови, или

при обнаружении антител в ИФА в титрах не менее 1:800 с рекомендациями повторного исследования крови, или

при обнаружении антител в ИФА в титре 1:400 требуется подтверждение положительного результата в одном из двух методов (РИФ или РАО) с рекомендациями повторного исследования крови.

При повторном исследовании крови окончательный положительный ответ выдается:

при нарастании титров в парных сыворотках (от 2-кратного и выше) в одном из трех методов исследования: РНИФ (титр 1:128 и выше), РАО (титр 1:160 и выше), ИФА (титр 1:800 и выше), или

при выявлении в парных сыворотках (в первой

и второй) двукратных и выше титров в РИФ или РАО без их нарастания, или

при повторном обнаружении титра 1:800 в ИФА в парных сыворотках без его нарастания.

При наличии клинико-рентгенологической картины острой пневмонии или затяжного бронхита без бронхообструктивных явлений, данных эпиданмнеза (контакт с промышленными или иными системами кондиционирования, увлажнение воздуха или пылеподавление, наличие горячего водоснабжения в квартире, частые командировки с проживанием в гостиницах и др.) и вышеуказанных результатов исследования крови рекомендуется постановка диагноза болезни легионеров и подача экстренного извещения в ЦГСЭН с целью официальной регистрации заболеваемости.

При подозрении на легионеллез на основании клинических данных или получении первичных положительных серологических результатов рекомендуется как можно более раннее проведение бронхоскопии таким больным с направлением бронхоальвеолярного смыва для бактериологического исследования на легионеллез.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что реакция объемной агломерации с использованием легионеллезного серогруппы 1 антигенного полимерного диагностикума является надежным методом серологического подтверждения диагноза болезни легионеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева В.И., Прозоровский С.В., Русакова Е.В. и др. // Журн. микробиол. – 1986. – № 7. – С. 75–79.
2. Герчикова Н.М., Деммес Л.А., Бодюль В.Н. и др. // Там же. – 1990. – № 10. – С. 95–98.
3. Карбышев Г.Л., Мишанькин Б.Н., Ломов Ю.М. и др. // Там же. – 1993. – № 6. – С. 44–45.
4. Покровский В.И., Прозоровский С.В., Тартаковский И.С. и др. // Там же. – 1988. – № 10. – С. 24–27.
5. Тартаковский И.С., Радченко О.В., Русаков Е.В. и др. // Там же. – 1989. – № 11. – С. 34–36.
6. Эпидемиология, профилактика легионеллеза и борьба с ним: меморандум совещания ВОЗ // Бюл. ВОЗ. – 1990. – Т. 68, № 2. – С. 7–17.
7. Reingold A.L. // Rev. Inf. Dis. – 1988. – Vol. 10. – P. 1018–1028.

G.L.Karbyshv, A.N.Terentiev, E.V.Bezuglova, I.R.Simonova,
A.P.Kochetkova, V.Ya.Sklarskaya, A.A.Mater

**Construction of the Preparations
for Serologic Diagnosis of Legionellosis.
Communication 2. Trials of the Serogroup 1
Legionellosis Antigenic Polymer Diagnosticum
for the Reaction of Voluminous Agglomeration
in Practical Laboratory Diagnosis of Pneumonic Diseases**

Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute;
Municipal Pulmonary Center; Rostov-on-Don Regional Clinical Hospital

Summarized in the work are the results of practical use of the voluminous agglomeration test with serogroup 1 legionellosis antigenic polymer diagnosticum to diagnose respiratory diseases in pulmonary hospitals during the period from 1997 to 2004. Three diagnostic methods were comparatively analyzed: the indirect immunofluorescence test, the immuno-enzyme assay, and the voluminous agglomeration test. The diagnostic preparation for VAT constructed in the Rostov APRI proved to be a reliable tool for serologic certification of legionellosis clinical diagnosis.

Key words: legionellosis, diagnosticum.

Поступила 26.05.05.