

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ИММУННОЙ ПРОСЛОЙКИ НАСЕЛЕНИЯ
САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ К НЕКОТОРЫМ АРБОВИРУСАМ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры

06.04.01 Общая биология

Биологического факультета

Блиновой Ксении Дмитриевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


9.06.23

Е. В. Глинская

Научный консультант:

канд. биол. наук, с.н.с. отдела

диагностики инфекционных

болезней


9.06.23

Е. В. Найденова

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук


9.06.23

С. А. Степанов

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы

Многие годы на территории Российской Федерации ведется мониторинг за распространением особо опасных инфекций и их переносчиков. Большую опасность представляют арбовирусы, которые являются возбудителями зоонозных природно-очаговых инфекций с трансмиссивным способом передачи, то есть через укус кровососущих членистоногих. Большинство вирусов этой группы относят ко второй группе патогенности, характеризующиеся как возбудители высококонтагиозных эпидемических болезней. Они вызывают тяжелые инфекционные заболевания, связанные с развитием геморрагического синдрома на фоне острого лихорадочного состояния, или приводят к нарушениям работы центральной нервной системы [1].

Согласно государственному докладу «О состоянии санитарно – эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году», было отмечено увеличение случаев заболевания арбовирусными инфекциями. От количества всех зарегистрированных случаев заболеваний природно-очаговыми инфекциями, доля по клещевому энцефалиту (КЭ) составила 11,2 %, по лихорадке Западного Нила (ЛЗН) (76 случаев – 0,8 %) и по Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ) (49 случаев – 0,5 %) [2].

Данные факты могут указывать на возможности создания неблагоприятной эпидемиологической обстановки по этой группе возбудителей на территории области. Это связано с тем, что Саратовская область граничит с районами, на которых определены природные очаги арбовирусных инфекций. В частности, на территории Волгоградской области и Республики Казахстан установлена циркуляция возбудителей Крымской геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила, а на территории Самарской области выявлены очаги клещевого энцефалита [3 – 5].

В течение нескольких десятков лет сотрудники Российского научно - исследовательского противочумного института «Микроб» ведут работу по

изучению циркуляции некоторых арбовирусов на территории Саратовской области. Так, в исследованиях, проведенных в 2006 - 2009 г. при анализе сывороток крови населения, проживающего в разных районах области, было выявлено 78 (7,6 %) образцов, содержащих специфические антитела к арбовирусам [6].

Особое внимание уделяется наблюдению за циркуляцией возбудителя лихорадки Западного Нила, что связано с неблагоприятной обстановкой и случаями инфицирования людей данным вирусом в некоторых районах области. Впервые случаи заболевания ЛЗН в области были установлены в 2012 г., при исследовании проб от пациентов с диагнозом лихорадки неясной этиологии. Кроме того, в работах по изучению циркуляции ВЗН на территории области, маркеры вируса были обнаружены в полевом материале от комаров и мелких млекопитающих, а также в сыворотках крови людей и крупного рогатого скота [7,8].

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение уровня иммунной прослойки населения Саратовской области к некоторым арбовирусам: Крымской - Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), Западного Нила (ЗН), клещевого энцефалита, Синдбис, Батаи и калифорнийской серогруппы (КСГ).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Создать панели образцов сывороток крови от практически здоровых людей, проживающих в разных районах Саратовской области.
2. Выполнить исследование созданных панелей для обнаружения антител к арбовирусам в сыворотках крови жителей Саратовской области в 2020 – 2022 гг.
3. Выявить антитела к арбовирусам в сыворотках крови жителей, проживающих в различных климато - географических зонах Саратовской области.

4. Сделать сравнительный анализ выявления антител к арбовирусам в разные годы исследования.

Материал и методы исследования

Работа проводилась в 2021 – 2022 г. на базе отдела диагностики инфекционных заболеваний ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

В работе исследовали сыворотки крови практически здоровых людей, проживающих в разных районах Саратовской области. Материал был получен осенью по окончании эпидемиологического сезона. Всего число анализируемых образцов составило 1800, при этом в каждый из годов (2020 - 2022), вошедших в исследование, материал доставлялся в равном количестве по 600 проб.

Исследование проводилось в соответствии действующими санитарными правилами и нормами, содержащимися в утвержденном СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 01.09.2021», а также в рамках приказа от 01.12.2017 г. №1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Образцы сывороток крови изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для выявления специфических антител класса IgG к исследуемым возбудителям, использовали соответствующие наборы реагентов. Постановку и учет ИФА проводили согласно инструкции, прилагающейся к набору.

Для исследования сывороток крови на наличие специфических иммуноглобулинов к вирусам ЗН, ККГЛ, КЭ, Синдбис, Батаи и КСГ использовали соответствующие набор реагентов для выявления антигенов класса IgG - «БиоСкрин-ВЗН (IgG)», «БиоСкрин-ККГЛ (IgG)», «БиоСкрин-КЭ (IgG)», «БиоСкрин-Синдбис (IgG)», «БиоСкрин-Батаи (IgG)» и «БиоСкрин-КСГ (IgG)» (АО БТК «Биосервис», Россия).

Для проведения анализа были использованы образцы сывороток в объеме 20 мкл, которые десятикратно разводились раствором для предварительного разведения в чистом планшете.

При постановке в планшете размещали необходимое количество стрипов. Во все С-лунки вносили по 100 мкл рабочего разведения специфического антигена, а во все К – лунки также добавляли по 100 мкл контрольного антигена. Подготовленный планшет заклеивали листом пленки и выдерживали в течение 60 минут в термостате при температуре (37 ± 1) °С. После планшет трехкратно промывали растворами для промывки по 250 мкл, выдерживая в лунках не более 20 секунд.

Для каждого анализируемого образца использовали две параллельные С и К – лунки. В две первые С – лунки и две К – лунки вносили по 90 мкл рабочего раствора и 10 мкл каждого контрольного образца. В остальные свободные лунки к 90 мкл рабочего раствора вносили по 10 мкл разведенных исследуемых проб. После планшет заклеивали листом пленки и выдерживали в течение 60 минут в термостате при температуре (37 ± 1) °С. После трехкратно промывали. Затем во все лунки вносили по 100 мкл рабочего разведения конъюгата и также оставляли выдерживать под пленкой в течение 60 минут при температуре (37 ± 1) °С. Планшет шестикратно промывали.

На заключительном этапе в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл индикаторного раствора и оставляли в неосвященное место на 15 минут при температуре от +15. °С до +25 °С. Для остановки реакции в лунки добавляли по 50 мкл стоп – реагента.

Учет результатов проводили с помощью ИФА-спектрофотометра IMark (Bio-Rad, США). Выведение спектрофотометра на нулевой уровень осуществляли по воздуху. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм. Полученные результаты на контрольных лунках, должны соответствовать следующим параметрам:

Интерпретация результатов проводилась в соответствии с полученными расчетами и инструкцией, прилагаемой к наборам реагентов, в соответствии со следующими требованиями:

1. ОП в С – лунке $\geq 0,35$
2. ОП в С – лунке $> 3 \times \text{ОП}_{\text{срК}^- \text{Г}}$
3. ОП в С – лунке $> 3 \times \text{ОП в К – лунке}$
4. ОП в К – лунке $\leq 0,3$ о.е. [9 - 13].

Также, выявленные положительные пробы к вирусу ЗН ставили на референсной тест системе «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» («Euroimmun», Германия) для подтверждения наличия в исследуемых сыворотках антител к данному вирусу.

Для этого в соответствии с инструкцией набора, образцы сывороток крови разводились 1:100 буфером для образцов. Анализ состоял из трех последовательных стадий. На первой стадии в лунки планшета вносили по 100 мкл калибратора, положительного и отрицательного контроля, а также подготовленных разведенных образцов. Затем планшет закрывали пленкой и инкубировали в течение 60 минут при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После следовала трехкратная промывка. На второй стадии в каждую лунку добавляли по 100 мкл ферментного конъюгата и повторяли действие с инкубацией и последующей промывкой. В третью стадию в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора хромогена/субстрата. После чего планшет оставляли на 15 минут при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания прямых солнечных лучей. Остановку реакции проводили с добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп – реагента.

Фотометрические измерения интенсивности окрашивания раствора в лунках проводили с помощью ИФА-спектрофотометра IMark (Bio-Rad, США) при основной длине волны 450 нм и при сравнительной длине 620 – 650 нм.

Учет результатов оценивался полуколичественным методом, определяя отношение оптической плотности (ОП) в лунке с контрольным образцом или

в лунке с исследуемым образцом относительно ОП лунки с калибратором. Расчет полученных данных осуществлялся по формуле:

$$\text{Отношение (RATIO)} = \frac{\text{ОП контрольного или исследованного образа}}{\text{ОП калибратора}}$$

Полученные данные учитывались как положительные при отношении $(\text{RATIO}) \geq 1,5$ [14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием Python. Расчет значений доверительных интервалов делали формуле Уилсона.

Структура и объем работы. Работа изложена на 43 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 1 рисунком. Список использованных источников включает в себя 67 наименований.

Научная новизна

Проведенная работа подтверждает циркуляцию некоторых арбовирусов на территории Саратовской области. Полученные результаты по изучению иммунной прослойки населения позволили оценить эпидемиологическое значение исследованной группы вирусов и установить неблагоприятную обстановку по распространению вируса Западного Нила в области.

Научная значимость

Научная значимость исследования заключается в получении актуальных данных о распространении арбовирусов на территории Саратовской области в 2020 - 2022 гг. Результаты работы могут быть использованы для разработки плана дальнейшего мониторинга за циркуляцией изучаемых арбовирусов.

Положения, выносимые на защиту

1. В различных климатогеографических зонах Саратовской области активно циркулируют вирусы ЗН, ККГЛ, КЭ, Батаи, Синдбис и КСГ.

2. Выявленные положительные результаты наличия в исследуемых сыворотках крови населения специфических антител класса IgG к изучаемым вирусам, свидетельствует о контакте с возбудителями арбовирусных инфекций.
3. В рамках проведенной работы установлено возможное создание неблагоприятной обстановки по распространению на территории Саратовской области вируса Западного Нила.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена характеристика основных отрядов и семейств, относящихся к группе арбовирусов. Рассмотрены основные переносчики, пути передачи и клинические картины, развивающиеся при заболевании инфекциями, возбудителями которых являются изучаемые вирусы, а именно: Крымской - Конго геморрагической лихорадки, Западного Нила, клещевого энцефалита, Синдбис, Батаи и Калифорнийская серогруппа.

В главе «Результаты исследования» описаны и проанализированы полученные данные иммуноферментного анализа по выявлению специфических антител класса IgG к изучаемым вирусам.

Всего было исследовано 1800 образцов сывороток крови жителей Саратовской области. Из этого количества было выявлено 249 (13,8%) проб, содержащих антитела класса IgG к арбовирусам. Вместе с тем, высокий процент положительных результатов был обнаружен к вирусу Западного Нила - 129 (7,2%) образцов. Специфические иммуноглобулины также были выявлены к вирусам ККГЛ в 21 (1,2%) пробах, к КЭ в 12 (0,6%), к Батаи в 24 (1,3%), к Синдбис и КСГ в 30 (1,6%) и 33(1,8%) образцах соответственно.

Учитывая климат - географические особенности и то, что на территории области располагаются три климатические зоны: лесостепная, степная и полупустынная, был проведен анализ полученных результатов по этим зонам.

В большинстве, положительные результаты были получены в сыворотках крови людей, проживающих в степной зоне, и их количество составило 133 (7,3%) образца. Причем, наибольшее количество исследуемых проб, содержали антитела к вирусу Западного Нила – 81 (4,5%). Также, в материале из данной природной зоны, были выявлены специфические антитела класса IgG к вирусам: ККГЛ в количестве 8 (0,4%) проб, КЭ 4 (0,2%), к вирусу Батаи 7 (0,3%), Синдбис 14 (0,7%) и к КСГ 19 (1,1%).

При исследовании сывороток крови людей, живущих в районах, которые относятся к лесостепной зоне, было установлено 68 (3,7%) положительных образцов. Из них количество проб, содержавших антитела к вирусам, составило: к ВЗН - 26 (1,4%), к ККГЛ - 3 (0,2%), к Синдбис 11 (0,6%) и к вирусу КЭ 8 (0,4%). Также, было выявлено 10 (0,5%) проб, имеющих специфичные иммуноглобулины класса IgG к вирусам КСГ и столько же проб к Батаи.

Анализ сывороток крови, полученных от населения из районов полупустынной зоны, позволил выявить 48 (2,6%) положительных образцов. В частности, антитела к вирусу Западного Нила были обнаружены в 22 (1,2%) пробах, а к ККГЛ в 10 (0,5%). А также, определены образцы, содержащие антитела к вирусу Батаи – 7 (0,4%), к вирусу Синдбис – 5(0,2%) и к вирусам КСГ – 4 (0,2%). При этом, в исследуемом пуле сывороток, специфических иммуноглобулинов к вирусу клещевого энцефалита выявлено не было.

Для представления более полных данных по распространению на территории Саратовской области некоторых арбовирусов был также проведен сравнительный анализ результатов исследований, проведенных в 2006 - 2009 гг [6].

Анализ результатов показал, что число выявленных положительных проб, содержащих антитела класса IgG к вирусу Западного Нила, увеличилось на 6%, что является статистически значимо и подтверждается отсутствием трансгрессии доверительного интервала (ДИ) (график -1).

В отношении других вирусов количество установленных положительных результатов не сильно варьируется, оставаясь в пределах от 1% до 2%, поэтому нельзя говорить, что по полученным данным наблюдается увеличение количества выявленных проб, содержащих специфические антитела к данным вирусам. А также, наличие трансгрессия ДИ не позволяет говорить о статистически достоверных различиях.

Однако, факт того, что в исследуемом материале выявляются образцы, содержащие специфические антитела к некоторым арбовирусам, не исключает распространение данных возбудителей на территории области.

Выводы

1) В ходе исследовательской работы была сформирована панель из 1800 сывороток крови жителей Саратовской области, из которых 922 (51 %) принадлежали женщинам, а 878 – мужчинам (49 %).

2) Из общего количества исследуемых образцов сывороток крови было выявлено наличие специфических антител к изучаемым арбовирусам в 249 пробах. Из них количество проб, содержащих иммуноглобулины к вирусу ЗН, составило – 129 (7,2 %) образцов, к ККГЛ – 21 (1,2 %) к КЭ – 12 (0,6 %), к Батаи – 24 (1,3 %), к Синдбис и КСГ – в 30 (1,6 %) и 33(1,8 %) образцах соответственно.

3) В исследуемых сыворотках крови жителей, проживающих в степной и лесостепной зоне, были обнаружены антитела ко всем изучаемым арбовирусам. При этом, в исследуемом материале из полупустынной зоны не было выявлено проб, содержащих специфические иммуноглобулины к вирусу КЭ.

4) Сравнительный анализ выявления специфических антител к арбовирусам в разные годы исследования установил увеличение положительных результатов к вирусу ЗН в 10,75 раз, что подтверждает высокую активность данного возбудителя на территории Саратовской области.

Список использованных источников

- 1 Ющук, Н. Д. Инфекционные болезни: национальное руководство / Н. Д. Ющук. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1040 с.
- 2 О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с.
- 3 Кузнецова, Р.С. Зонирование территории Самарской области по природно-очаговой заболеваемости населения / Р. С. Кузнецова // Районирование территорий: принципы и методы. – Тольятти: Анна, 2018. – С. 300-306.
- 4 Смелянский, В.П. Современное состояние проблемы природно-очаговых инфекций на территории Волгоградской области / В.П. Смелянский, К.В. Жуков, Н.В. Бородай [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2021. – Т. 29, № 11. – С. 83-93
- 5 Байгенжеева, Р. К. Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости Конго-Крымской лихорадкой 2009-2018 годы в Республике Казахстан / Р. К. Байгенжеева, А.А. Аралбай, Н.А. Орынғалиев // Научная дискуссия современной молодёжи: актуальные вопросы, достижения и инновации: Сборник статей XII Международной научно-практической конференции. – 2020. – С. 164-167
- 6 Щербакова, С.А. Выявление специфических антител к арбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих на территории Саратовской области / С.А. Щербакова, Е.В. Найденова, Е.С. Билько [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Т. 2, № 108. – С. 72-74
- 7 Красовская, Т.Ю. Первые случаи лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области / Т.Ю. Красовская, Е.В. Найденова, Н.И. Миронова [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – . – Т. 9, № 3. – С. 495-501

8 Казорина, Е.В. Лихорадка Западного Нила на территории Саратовской области в 2013-2015 гг. / Е.В. Казорина, Т.Ю. Красовская, А.В. Казанцев [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 5. – С. 219 -226

9 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки и антител к нему методом иммуноферментного анализа «БиоСкрин-ККГЛ» (комплект G).

10 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса клещевого энцефалита и антител к нему методом иммуноферментного анализа «БиоСкрин-КЭ» (комплект G).

11 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса Батаи и антител к нему методом иммуноферментного анализа «БиоСкрин-Батаи» (комплект G).

12 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса Синдбис и антител к нему методом иммуноферментного анализа «БиоСкрин-Синдбис» (комплект G).

13 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вирусов Калифорнийской серогруппы и антител к ним методом иммуноферментного анализа «БиоСкрин-КСГ» (комплект G).

14 Инструкция по применению набора реагентов для выявления антигенов вируса Западного Нила и антител к нему методом иммуноферментного анализа - (Anti- West Nile virus ELISA (IgG)).

