

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИФА В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ НОРО- И РОТАВИРУСАМИ

Крипакова В.В., Золотавина М.Л.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: lera\_k13@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2020

**Аннотация.** В статье представлен анализ литературы об имеющихся на современном этапе методах диагностики острой кишечной инфекции (ОКИ) вирусной этиологии. В данной работе был рассмотрен метод ИФА, выявлены преимущества и недостатки в сравнении с другими известными методами лабораторной диагностики. Эффективность метода была подтверждена исследованием изменений концентрации антигена вирусов в образцах фекалий у больных рота- и норовирусной инфекцией в возрасте от 18 до 85 лет. Проведение ИФА с использованием набора реагентов Вектор-Бест позволило установить концентрацию антигенов вирусов в копроматериале больных, а также определить тяжесть течения заболевания у лиц разного возраста и пола. Было выяснено, что остро и тяжело протекала ротавирусная инфекция у женщин в возрасте 36-55 лет, со средней степенью тяжести – у мужчин в возрасте 36-60 лет. При норовирусной инфекции происходят кратковременные воспалительные изменения в слизистой оболочке тонкой кишки, сопровождающиеся умеренной интоксикацией.

**Ключевые слова:** острая кишечная инфекция, иммуноферментный анализ, норовирус, ротавирус.

### ВВЕДЕНИЕ

Острые кишечные инфекции (ОКИ) – группа острых инфекционных заболеваний человека, вызываемых различными инфекционными агентами с алиментарным механизмом заражения, характеризующиеся поражением желудочно-кишечного тракта, диареей, дегидратацией [1]. При острых кишечных инфекциях происходят нарушения полостного, пристеночного и внутриклеточного пищеварения, всасывания питательных веществ, а также моторной функции тонкой кишки. Это связано с тем, что вирусы, проникая в клетки ворсинок слизистой оболочки, начинают реплицироваться и приводят к гибели клеток. Происходит уменьшение числа энтероцитов, а по причине ускоренного митоза появляются структурно и функционально незрелые клетки, которые не успевают дифференцироваться. В просвете кишечника накапливаются нерасщеплённые дисахариды вследствие недостаточности ферментов, нарушается абсорбция моносахаридов, что приводит к повышению осмотического давления в полости толстой кишки, нарушению баланса между секрецией и всасыванием воды и электролитов и усиленной моторике кишечника. Это в свою очередь, ведёт к нарушению кислотно-основного состояния и развитию метаболического ацидоза [2]. Тяжесть болезни и продолжительность инкубационного периода ОКИ зависят от количества проникших в организм возбудителей, их патогенности, серотипа, а также состояния макроорганизма [3].

В государственном докладе «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было зарегистрировано в 2018 году более 816 тыс. случаев ОКИ (555,71 на 100 тыс. населения), при этом отмечался рост заболеваемости норовирусной инфекцией в 1,6 раза по сравнению с 2017 годом и составил 33,56 на 100 тыс. населения. Заболеваемость ротавирусной инфекцией в 2018 году находилась на уровне предшествующих лет (81,3 на 100 тыс. населения) [7].

Рота- и норовирусы имеют сложное строение и обладают всеми необходимыми приспособлениями, которые делают их успешными патогенами проксимального отдела тонкой кишки. Вирусы нарушают процесс переваривания и всасывания веществ в тонком отделе кишечника. Накопление избыточного количества негидролизированных углеводов в просвете кишки приводит к потере жидкости через желудочно-кишечный тракт. А некомпенсированная дегидратация может привести к патологическим изменениям всех видов обмена веществ, накоплению токсических метаболитов и их вторичным воздействиям на органы и ткани больных.

Диагностика ОКИ вирусной этиологии заключается в том, чтобы своевременно обнаружить и идентифицировать возбудителя заболевания, что позволит правильно поставить диагноз, подобрать необходимые лечебные мероприятия, назначить водо- и электролитозамещающую терапию, а также исключить необоснованное применение антибиотиков и антибактериальных препаратов.

Для проведения диагностики ОКИ вирусной этиологии необходимо выбрать правильный, надежный и быстрый метод исследования, который имеет высокую специфичность, воспроизводимость и чувствительность.

Согласно литературным источникам, в настоящее время в диагностике ОКИ, вызванной рота- и норовирусами, применяются методы, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1. Методы лабораторной диагностики рота- и норовирусной инфекции

Методы		Ротавирус	Норовирус
Морфологические (электронная микроскопия)		-	+
Молекулярно-биологические (ОТ-ПЦР)		+	+
Иммунологические (серологические)	Латекс-агглютинация	+	-
	Реакция пассивной гемагглютинации	+	-
	Радиоиммунный анализ	+	-
	ИФА	+	+
	Имунофльтрация	-	+
	Имунофлюоресценция	+	-
	Имунохроматографические экспресс-тесты	+	+

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СКИБ в г. Краснодаре в период с сентября 2018 года по апрель 2019 года. Были проанализированы данные обследования 348 человек с учётом возраста и пола, из них: 98 человек с ротавирусной инфекцией (59,2% женщин и 40,8% мужчин), 114 человек с норовирусной инфекцией (52,6% женщин и 47,4% мужчин).

Материалом исследования служили образцы фекалий у больных острой кишечной инфекцией, вызванной норо- и ротавирусами.

Методы исследования: иммуноферментный анализ, теоретические и метатеоретические (классификация, обобщение, системный синтез, аналогия, индукция, дедукция). Математическая обработка результатов методами вариационной статистики была произведена в программном приложении Microsoft Excel 2010. Определялись средняя арифметическая величина ( $\bar{X}$ ), стандартное отклонение ( $\pm m$ ), значимость различий ( $p$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной обзорной статье была проанализирована информация, связанная с использованием метода ИФА при диагностике острых кишечных инфекций, вызванных норо- и ротавирусами. Для подтверждения работы метода были определены изменения концентрации антигена вирусов в образцах фекалий у больных острой кишечной инфекцией, вызванной норо- и ротавирусами с использованием набора реагентов для ИФА Вектор-Бест.

*Метод определения антигена ротавируса* в фекалиях человека основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Принцип метода заключается во взаимодействии антигена ротавируса с антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Количество связанного конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ротавируса в анализируемых образцах. Затем измеряют величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

*Метод определения норовирусов* основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок с антигенами норовируса. После промывки во время второй инкубации вносят конъюгат стрептавидин-пероксидазы, который связывается с антителами. Комплекс «антиген-биотинилированное антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена норовируса в анализируемых образцах. Затем измеряют величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм [5].

Для оценки результатов анализа вычисляют критическое значение оптической плотности ( $ОП_{крит}$ ) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp}(K) + 0,2, \quad (1)$$

где  $ОП_{cp}(K)$  – среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным образцом, которое не превышает 0,20.

**Таблица 2.** Значения оптической плотности образцов и критическое значение оптической плотности образцов фекалий у мужчин и женщин, больных ротавирусной инфекцией

Пол	Возрастные группы	Оптическая плотность образцов	Критическое значение оптической плотности
М	20-35 лет	2,05±1,08	0,218±0,006
	36-60 лет	2,11±0,89	0,249±0,08
	61-80 лет	1,785±1,06	0,225±0,009
Ж	18-35 лет	1,80±0,98	0,222±0,01
	36-55 лет	2,59±0,86	0,2209±0,005
	56-85 лет	2,11±0,95	0,229±0,048

**Таблица 3.** Значения оптической плотности образцов и критическое значение оптической плотности образцов фекалий у мужчин и женщин, больных норовирусной инфекцией

Пол	Возрастные группы	Оптическая плотность образцов	Критическое значение оптической плотности
М	20-35 лет	1,59±0,99	0,251±0,011
	36-60 лет	1,15±0,65	0,258±0,02
	61-80 лет	1,49±1,04	0,255±0,01
Ж	18-35 лет	1,185±1,06	0,258±0,01
	36-55 лет	1,08±0,82	0,252±0,011
	56-85 лет	1,03±0,57	0,261±0,005

Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом равно или превышает  $OP_{\text{крит}}$  ( $OP_{\text{обр}} \geq OP_{\text{крит}}$ ). Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом ниже  $OP_{\text{крит}}$  ( $OP_{\text{обр}} < OP_{\text{крит}}$ ).

Значения оптической плотности образцов и критического значения оптической плотности образцов фекалий у больных рота- и норовирусной инфекцией в возрасте от 18 до 85 лет представлены в таблице 2 и 3.

Из таблиц 2 и 3 видно, что наиболее остро и тяжело протекала ротавирусная инфекция во второй возрастной группе женщин. Со средней степенью тяжести протекала ротавирусная инфекция во второй возрастной группе мужчин. Для норовирусной инфекции наиболее характерны непродолжительные симптомы гастроэнтерита, сопровождающиеся умеренно или слабо выраженным болевым и интоксикационным синдромом [9].

По сравнению с другими методами, ИФА имеет несколько преимуществ:

1. Норовирусы содержатся в копро материале в малых концентрациях. Помимо этого, они практически не отличаются морфологически от других вирусов, поэтому выявление вирусов в образцах фекалий с использованием электронной микроскопии является затруднительным. Чувствительность метода невысока – 35-50%. ПЦР-ОТ, в отличие от ИФА и электронной микроскопии, является более чувствительным и специфичным, но при наличии негативных факторов (низкие концентрации вируса, неправильное хранение образцов, неэффективность вирусной экстракции РНК, наличие ингибиторов обратной транскриптазы) этот метод показывает меньшую эффективность в обнаружении вируса в фекалиях. Чувствительность же тест-систем ИФА оценивается как 60–90% при специфичности, близкой к 100%, но на практике чувствительность метода не превышает 70% [6];

2. ИФА вытеснил бактериологические и вирусологические методы из лабораторной диагностики, поскольку для идентификации вируса требовалось достаточно много времени (выделение и выращивание на питательной среде от 48 до 72 часов). Культивирование ротавирусов сопряжено со значительными сложностями, а норовирус относят к некультивируемым вирусам. Поэтому перечисленные методы к ним неприменимы;

3. Большинство тест-систем и реактивов для ИФА, которые используются в клинической лабораторной диагностике, выпускаются в промышленных условиях, что гарантирует точный результат;

4. ПЦР-ОТ и различные модификации этого метода (мультиплексная ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «по конечной точке»; иммуно-ПЦР «по конечной точке» с детекцией в реальном времени; количественная ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени) являются долгими и

трудными в применении. Кроме того, оборудование для выполнения диагностики с помощью вышеперечисленных методов труднодоступно из-за высокой стоимости. Поэтому предпочтение отдается ИФА, т.к. этот метод доступен для практических лабораторий, прост в постановке, позволяет достаточно быстро получить результат, имеет цветовую кодировку растворов, а методики анализа легко поддаются автоматизации и широко используются при скрининговых исследованиях большого количества проб [8];

Недостатки использования ИФА:

1. В качестве альтернативы методу ИФА может быть использован иммунохроматографический экспресс-тест, чувствительность и специфичность которого близка к соответствующим показателям наборов для ИФА. При этом исследование выполняется быстро, проведение анализа и интерпретация результата очень просты, для проведения исследований не требуется специальное оборудование [10];

2. Методика ИФА подразумевает, что врач заранее имеет предположение о природе заболевания;

3. Метод ИФА – крайне точный, но не дешевый метод.

4. Метод ИФА не рекомендуется использовать для установления этиологии sporadic случаев норовирусной инфекции, так как он обладает недостаточной чувствительностью и специфичностью в отношении ряда генотипов норовирусов.

5. Существенными недостатками твердофазного ИФА являются необходимость предварительной калибровки и длительной пробоподготовки [4].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из анализа полученной информации, можно сделать вывод, что ИФА, относящийся к группе иммунологических методов, имеет прямое отношение к такому направлению как «Медицинская биофизика», поскольку является наиболее доступным, точным и экономичным методом клинической лабораторной диагностики для своевременной идентификации возбудителей острой кишечной инфекции вирусной этиологии.

Однако он не лишен и недостатков в сравнении с другими методами.

### Список литературы / References:

1. Баранов А.А. *Детские болезни*: учебник. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2002, 880 с. [Baranov A.A. *Children's diseases*: textbook. Moscow: GEOTAR-MED, 2002, 880 p. (In Russ.)]

2. Булатов В.П., Камалова А.А. Хроническая диарея у детей. *Практическая медицина*, 2012, № 7, с. 38-40. [Bulatov V.P., Kamalova A.A. Chronic diarrhea in children. *Prakticheskaya medicina*, 2012, no. 7, pp. 38-40. (In Russ.)]

3. Григорьев П.Я., Яковенко А.В. *Клиническая гастроэнтерология*: учебник. Москва: Медицинское информационное агентство, 2004, 768 с. [Grigoriev P.Ya., Yakovenko A.V. *Clinical gastroenterology*: textbook. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2004, 768 p. (In Russ.)]

4. Гутенева И.В. *Разработка методов иммунохроматографической детекции малых молекул с использованием магнитных наномаркеров*: специальность 03.01.02 «Биофизика»: дисс. ... канд. физ.-мат. наук / Гутенева Наталия Викторовна: Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет). Москва, 2019, 119 с. [Guteneva I. V. *Development of methods for immunochromatographic detection of small molecules using magnetic nanomarkers*: specialty 03.01.02 "Biophysics": dissertation ... candidate of physical and mathematical Sciences / Natalia Guteneva: Moskovskij fiziko-tekhnicheskij institut (nacional'nyj issledovatel'skij universitet). Moscow, 2019, 119 p. (In Russ.)]

5. *Инструкция по применению набора реагентов для ИФА Вектор-Бест*. Режим доступа: <http://art-medika.com/catalog/IFA/infection/virusy> (дата обращения 06.07.2020). [Instructions for using a set of reagents for ELISA Vector-best. Access mode: <http://art-medika.com/catalog/IFA/infection/virusy> (date of request: 06.07.2020) (In Russ.)]

6. Хохлова Н.И., Капустин Д.В., Краснова Е.И., Извекова И.Я. Норовирусная инфекция (обзор литературы). *Журнал инфектологии*, 2018, № 10, с. 5-14. [Khokhlova N.I., Kapustin D.V., Krasnova E.I., Izvekova I.Ya. Norovirus infection (systematic review). *ZHurnal infektologii*, 2018, no. 10, pp. 5-14. DOI: 10.22625/2072-6732-2018-10-1-5-14. (In Russ.)]

7. *О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году*: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019, 254 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'j i blagopoluchija cheloveka, 2019, 254 p. (In Russ.)]

8. Жираковская Е.В., Игнатьев Г.М., Индикова И.Н., Тикунова Н.В. Оценка новой ИФА тест-системы «Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2009, № 3-4, с. 23-38. [Jirkovskiy E.V., Ignatiev G.M., Indikov I.N., Tikunova N.V. Evaluation of the new ELISA test system «Rotavirus-antigen-ELISA-BEST» *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*, 2009, № 3-4, pp. 23-38. (In Russ.)]

9. Сагалова О.И. *Клинико-иммунологическая характеристика кишечных инфекций вирусной этиологии у взрослых*: специальность 14.00.10: автореферат дисс. ... д-а мед. наук / Сагалова Ольга Игоревна: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ РФ. Москва, 2009, 42 с. [Sagalova O.I. *Clinical and immunological characteristics of intestinal infections of viral etiology in adults*: specialty 14.00.10: abstract of the

dissertation ... of the doctor of medical Sciences / Sagalova Olga Igorevna: Central'nyj nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii MZ RF. Moscow, 2009, 42 p. (In Russ.)]

10. *Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции: 3.1.1 Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции: методические указания: МУ 3.1.1.2969-11 / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва: Роспотребнадзор: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012, 34 с. [Epidemiological surveillance, laboratory diagnostics and prevention of norovirus infection: 3.1.1 prevention of infectious diseases. Intestinal infections: guidelines: MU 3.1.1.2969-11 / Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare. - Moscow: Rospotrebnadzor: Federal'nyj centr gigeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2012, 34 p. (In Russ.)]*

#### USING THE ELISA METHOD IN THE DIAGNOSIS OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS CAUSED BY NORO-AND ROTAVIRUSES

**Kripakova V.V., Zolotavina M. L.**

Kuban state University

*Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: lera\_k13@mail.ru*

**Abstract.** The article presents an analysis of the literature on currently available methods for diagnosing acute intestinal infection (Oki) of viral etiology. This work considers the ELISA method, identifies its advantages and disadvantages compared to other known methods of laboratory diagnostics. The effectiveness of this method was confirmed by the study of changes in the concentration of viral antigen in fecal samples of patients aged 18 to 85 with rot and norovirus infection. Carrying out ELISA with use of a set of reagents vector-best allowed to establish the concentration of viral antigens in the copromaterial of patients, as well as to determine the severity of the disease in individuals of different ages and genders. It was found that rotavirus infection was acute and severe among women of age 36-55 and with an average degree of severity among men of age 36-60. During the norovirus infection, short-term symptoms of gastroenteritis accompanied by moderate or light pain and intoxication syndrome, are most characteristic.

**Key words:** *acute intestinal infection, enzyme-linked immunosorbent assay, norovirus, rotavirus.*