
**ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ
К КАПСУЛЬНЫМ ПОЛИСАХАРИДАМ МЕНИНГОКОККОВ,
ВЫЯВЛЕННЫХ АСУW 135, АС, А
ЛАТЕКСНЫМИ ДИАГНОСТИКУМАМИ
В СЫВОРОТКАХ НАСЕЛЕНИЯ ЭФИОПИИ**

А.В. Харитонов, А.П. Аллилуев

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Медицинский факультет
Российский Университет Дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

С.А. Харг

Кафедра микробиологии и генито-уринальной медицины
Ливерпульский университет
Ливерпуль. Долби стрит, Дункан Билдинг, L693GA, Великобритания

Разработанные АСУW 135, АС и А менингококковые латексные диагностикумы были использованы для выявления зависимости уровней противоменингококковых антител от возраста в 192 образцах сывороток населения Эфиопии. Наибольший высокий титр был показан в возрастной группе 20—24 года. Полученные данные подтвердили диагностическую ценность латексных диагностикумов на основе группоспецифических полисахаридов и выявили достаточно высокий уровень антител к капсульному полисахариду серогруппы А в сыворотках населения Эфиопии, что соответствует постэпидемическому периоду 2003 года.

В начале 21 века вспышки заболеваемости менингококковой инфекцией (МИ) достигли эпидемиологических масштабов. В России случаи менингококковой инфекции регистрировались на уровне до 2,0—2,3 на 100 тыс. населения. Тем не менее географический анализ показывает, что в настоящее время существует несколько районов, в которых сохранялось неблагополучие по МИ. В первую очередь, это группа дальневосточных областей, расположенных недалеко от границы с Китаем и Монголией (Хабаровский и Приморский край, Магаданская и Амурская область, Бурятия и др.). Здесь заболеваемость в отдельные годы достигала 6—8 случаев на 100 тыс. населения. Другим регионом со стабильно высокой заболеваемостью, от 3 до 4 на 100 тыс., является север европейской части России — Архангельская и Мурманская области.

Заболеваемость МИ в мире по-прежнему определяется, в первую очередь, эпидемиями в странах «менингитного пояса»: Буркина-Фасо в 2001—2003, 2006 гг., Нигере в 2002—2003, 2006 гг., Эфиопии в 2001—2002 гг., Бенине в 2001 г., Судане в 1999 г. и других [7]. По данным ВОЗ, за первые 10 недель в 2006 году в этих странах вспышки произошли в 32 районах из 7 стран, где было зарегистрировано 5719 выявленных случаев, включая 580 смертей. Случаи локализовались, в основном, в западной Африке: Буркина-Фасо, Мали и Нигерии, где доминировала серогруппа А; и в восточной: Кении, Судане и Уганде, где преобладала *Neisseria manintidis* серогруппы W135. Однако число заболевших МИ на африканском континенте в год не превышало 20—30 тыс., т.е. было почти

в 10 раз ниже, чем во время эпидемии в 1995—1996 гг. В Европе наивысшее число заболеваний, от 6 до 13 на 100 тыс. населения, наблюдалась в островных государствах — Исландии, Ирландии, Северной Ирландии и Мальте, а также в Шотландии. Число заболеваний от 3 до 6 на 100 тыс. населения регистрировалось в некоторые годы в Англии, Уэльсе, Бельгии и Голландии, Испании.

Улучшение диагностики МИ Менингококковой лабораторией в эпидемические годы 1993—1994 и 2003—2004 позволило поставить диагноз в увеличившихся случаях некультивируемых штаммов с помощью *ctrA* и *siaD* ПЦР анализа и дополнить изучением фенотипических характеристик изолятов. Это позволило выявить увеличение распространенности серогруппы С в определенных возрастных группах и связанное с этим повышение смертности с 1995—1996 по 1999—2000, что вызвало необходимость проведения вакцинации недавно лицензированной менингококковой конъюгированной (МКС) серогруппы С вакциной населения Англии в возрасте до 25 лет (в ноябре 1999 г.). Длительное увеличение и преобладание случаев заражения серогруппой В (1993—1994 по 2000—2001) наблюдалось с изменением фенотипических характеристик штаммов. Это было ассоциировано с преобладанием фенотипической комбинации серогруппы, серотипа и серосубтипа: снижением С : 2b и В : 2b менингококков и снижением В : 15 : P1.7,16 с сопровождающимся увеличением В : 4 : P1.4 в течение более чем 11 лет. Детализированный рутинный исследовательский мониторинг подтвердил наличие W135 : 2a : P1.5,2 менингококков в Англии в течение 2000 и 2001.

Важность постоянного мониторинга подтверждена необходимостью контроля эффективности МКС вакцины и выявления изменений циркулирующих штаммов менингококков для проведения противоэпидемических мероприятий, направленных на защиту населения вакциной серогруппы В. Анализ штаммов типированием методом мультилокусным секвенированием (МЛСТ) выявил уникальный комплекс ST-4821 и показал, что он был причиной двух вспышек менингококковой инфекции серогруппы С в течение 2 сезонов с 2003 по 2005 год в провинции Анхуй (Китай). Выявление этого сиквенс-типа имеет эпидемиологическую важность и определяет необходимость эпидемиологического мониторинга в Китае и во всем мире.

Для большинства названных стран был характерен абсолютный и относительный рост заболеваемости, вызванной менингококками серогруппы С. В Новой Зеландии продолжалась, начавшаяся в 1991 г. эпидемия МИ с показателем заболеваемости около 14 на 100 тыс., при этом большинство выделенных менингококков имело антигенную формулу В:4:P1.7,4 и принадлежало к генетической линии III, комплексу ST41/44. С 1986 серогруппа В *Neisseria meningitidis* вызывала до 80% случаев МИ в Бразилии. Во время эпидемии в Сан Паоло в 1988 был выделен *N. meningitidis* В:4:P1.15. Интересно, что изолированный в Касабланке (Марокко) наиболее часто регистрируемым являлся этот же фенотип В:4:P1.15 *Neisseria meningitidis*. В прочих странах высокий уровень заболеваемости МИ или ее угрожающий подъем не наблюдались. Тем не менее в эти благополучные годы произошел ряд важных событий, дополнивших наши представления об эпидемиологии менингококковой инфекции и перспективах борьбы с ней. Кроме того, было проведено изучение возрастных категорий лиц с целью возможной вакцинопрофилактики.

Простота, чувствительность и специфичность реакции латекс-агглютинации при проведении скрининга больших популяций позволяет быстро и дешево выявлять людей с высоким уровнем противоменингококковых антител, защищающих их от заражения МИ, что является особо актуальным для развивающихся стран.

Целью этого исследования является изучение зависимости уровней антител к капсульным полисахаридам А, С, Y, W135 серогрупп *N. meningitidis* антигенов от возраста при тестировании образцов сывороток крови населения Эфиопии разработанными диагностикумами на основе полимерных микросфер.

Материалы и методы. Были использованы разработанные латексные диагностикумы (ЛД), полученные при иммобилизации АСYW135, АС и А серогрупповых капсульных полисахаридов (КП) менингококков на латексы из полистерола разных размеров: 0,8 мкм, 1,1 мкм, 3,0 мкм и цветов (белый и синий — «Sigma-Aldrich», UK). В качестве сенсibiliзирующих агентов были использованы капсульные полисахариды из АС, АСXYW135 серогрупп вакцин, выпускаемых фирмой («Merieux», Франция), а также А-серогруппы полисахаридной вакцины (Россия). Микросферы из полистерола были покрыты А, С, Y, W135, АС или А капсульными полисахаридами, которые реагировали с группоспецифичными антителами *N.meningitidis*.

Частицы латекса были отмыты двукратным центрифугированием фосфатным буфером pH = 7,8. Концентрация полимерной суспензии была 1% до сенсibiliзации. Латекс был смешан в эквивалентном объеме 1 мл с выбранной концентрацией 6,25 мкг/мл менингококкового антигена. После инкубации суспензии в глициновом буфере pH = 7,8 в течение часа идет инактивация свободных групп. Рабочая концентрация латекса в планшете 0,05%. Несенсибилизированный латекс был взят в качестве контроля неспецифического связывания. Постановка РЛА осуществлялась в планшетах микротитраторами с двукратным шагом разведений, начиная с цельной сыворотки.

Антитела к АСYW135, АС, А капсульным полисахаридам менингококков были тестированы в сыворотках 194 людей из Эфиопии. Сыворотки забирались на 1—2-й и 7—10-й дни с момента постановки диагноза менингококковой инфекции. Из них (93,8%) всего 182 были мужчины. Возраст обследованных был от 17 до 65 лет. Для изучения провели разделение на возрастные группы 17—19, 20—24, 25—39, 40—59 лет и более 60 лет (табл. 1).

Таблица 1

Возрастное распределение титров антител к серогруппам АСYW135 менингококков

| Возраст, лет | Кол-во обследован. | Обратные титры противоменингококковых антител в сыворотке | | | | | | | | | Средний титр |
|--------------|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|-----|------|--------------|
| | | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | ≥256 | |
| 17—19 | 19 | 5 | 4 | 3 | 2 | | 1 | 1 | 1 | 2 | 40,68 ± 0,2 |
| 20—24 | 30 | 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 7 | 70,7 ± 2,52 |
| 25—39 | 88 | 15 | 13 | 13 | 13 | 9 | 6 | 1 | 1 | 17 | 57,5 ± 1,31 |
| 40—59 | 50 | 12 | 10 | 2 | 16 | | 3 | | 1 | 6 | 38,32 ± 1,1 |
| >60 | 7 | 2 | | | 1 | 2 | 1 | | | 1 | 48,86 ± 1,9 |
| Всего | 194 | 39 | 31 | 22 | 36 | 14 | 12 | 3 | 4 | 33 | |

Результаты исследования. При титровании разработанными латексными диагностикумами уровней противоменингококковых антител к КП А, АС, АСУW135 серогрупп в сыворотках населения Эфиопии выявлено, что число людей, в чьих сыворотках не содержалось антименингококковых антител к АСУW135 КП, составило 20,1%. Только 36% (70 из 194) вырабатывали низкий уровень антител и имели титр антител $(\log)2$. Процент людей, имевших титр антител $(\log)4$ и выше составил 34,4% обследованных. Несмотря на большое число людей с низкими титрами антител, было продемонстрировано наличие высокого уровня противоменингококковых антител $(\log)8$, которые были выявлены у 19,3% обследованных людей в возрасте 25—39 лет. Максимальный титр противоменингококковых антител $(\log)8$ был выявлен у 17,0% людей во всех возрастных группах. Наибольшее среднее значение титра $3,66 \pm 0,12$ АСУW135, АС и А ЛД было показано в возрастной группе 20—24 года, эта разница была статистически достоверной по сравнению с другими возрастными группами ($p \leq 0,5$). Титр антител к АСУW135 и АС КП был низким и равнялся титру $(\log)8$ рассматривался защищающим, потому что только 52,6% переболевших людей имели этот титр выше, чем $3((\log)8)$.

Таблица 2

Возрастное распределение титров антител к серогруппе А капсульного полисахарида менингококков

| Возраст, лет | Кол-во обследованных | Обратные титры противоменингококковых антител в сыворотке | | | | | | | | | Средняя величина |
|--------------|----------------------|---|----|----|----|----|----|----|-----|------------|------------------|
| | | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | ≥ 256 | |
| 17—19 | 19 | 7 | 3 | 2 | 2 | | 1 | 1 | 1 | 2 | $38,9 \pm 1,02$ |
| 20—24 | 30 | 10 | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 7 | $71,9 \pm 2,18$ |
| 25—39 | 88 | 19 | 11 | 11 | 13 | 9 | 6 | 1 | 1 | 17 | $57,39 \pm 1,87$ |
| 40—59 | 50 | 17 | 13 | 0 | 16 | | 3 | | 1 | 6 | $38,5 \pm 1,11$ |
| >60 | 7 | 2 | | | 1 | 2 | 1 | | | 1 | $46,86 \pm 1,52$ |
| Всего | 194 | 55 | 28 | 15 | 36 | 14 | 12 | 3 | 4 | 33 | |

Обсуждение результатов. В медицинской практике латексные диагностикумы широко распространены [2, 3, 4, 5, 9]. Было показано, что РЛА является более чувствительной, чем культуральный метод [5, 9] или коагулирование [5] и была показана сходная чувствительность с реакцией пассивной гемагглютинации [9, 5]. Стабильность диагностикумов, сконструированных на основе синтетических носителей, позволяет широко применять в серологии для раннего выявления менингококковой инфекции и оценки уровня противоменингококкового иммунитета [5]. Предрасположенность к менингококковой инфекции зависит от присутствия в сыворотке бактерицидных антител [6].

В работах Goldshneider и других [1, 6] 1960 при изучении сывороток добровольцев показано, что при использовании бактерицидных антител индивидуумы с титром циркулирующих антител более 4 были защищены от заражения менингококковой инфекции серогруппы С. В отсутствии вакцинации такие антитела вырабатываются в низком титре при носительстве менингококков, и также могут быть перенесены транспланцентарно от матери к ребенку [1]. Полученные высокие титры противоменингококковых антител мы можем объяснить тем, что эти сыворотки были собраны от людей, перенесших эпидемии в Эфиопии в 1989,

1999 г. [7]. Высокие титры противоменингококковых антител защищают людей от заболевания и смерти при менингококковой инфекции [6]. Нами было показано ранее [2], что уровень АТ (1 : 40) является протективным. Полученные данные также показали наличие зависимости между присутствием бактерицидных антител в сыворотке и защиту от заражения менингококковой инфекцией (обзор Frash [8]). Безусловно, имея моновакцину серогруппы А, можно установить уровень АТ у переболевших менингококковой инфекцией серогруппы А. В нашем случае, кроме моновакцины А, дивакцины А+С и тетравакцины А+С Y+W135, выявлены аналогичные титры антител. Полученное ранее различие уровней противоменингококковых антител к капсульным полисахаридам, выявленных при помощи АСYW135, АС и А серогрупп латексных диагностикумов в одних и тех же сыворотках, было статистически не значимым [10]. Таким образом, мы можем заключить, что выявленные антитела принадлежали серогруппе А и что титруются одни и те же антитела, синтезированные к капсульному полисахариду серогруппы А (табл. 2). Это помогло подтвердить серологически, что эпидемия была вызвана менингококками серогруппы А, а также установить уровень коллективного иммунитета. Так как известно, что эпидемии в Эфиопии были вызваны А серогруппой *N. meningitidis* [7], мы можем подтвердить это также. На основе полученных данных можно прогнозировать количество людей, которые подлежат вакцинации.

Проведенное тестирование по выявлению уровня противоменингококковых антител сывороток из Эфиопии показало высокую диагностическую ценность разработанных латексных диагностикумов. Данные о превалировании противоменингококковых антител серогрупп АСYW135 и АС, А у населения Эфиопии в литературе малочисленны. Таким образом, является важным выявление уровня антител до проведения вакцинации менингококковой вакциной. Эти данные могут быть использованы для улучшения оценки вакцинных программ, изучения эпидемиологии и помогают выявлению связи корреляции с защитой. В этой работе были изучены уровни антител в разных возрастных группах. Как и в изучении Goldshneider и других [6] было проведено сравнение заболеваемости по возрастным группам, и мы планируем провести дальнейшее изучение зависимости защиты для серогрупп АСYW135, АС и А менингококковой инфекции.

По нашим данным и данным других авторов процент не нуждающихся в профилактических противоменингококковых прививках достаточно велик. Это существенно снижает затраты на приобретение вакцинных препаратов и организацию прививочной компании, что особо актуально для ряда территорий нашей страны, а также для развивающихся стран, где заболеваемость МИ все еще высока.

Предложенный метод латексной агглютинации планируется использовать для диагностики уровня противоменингококкового иммунитета в регионах с высоким риском возникновения вспышки МИ, что является важным для эпидемиологического прогноза и решения вопроса вакцинации в этом регионе.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Goldschneider I., Gotschlich E.C., Artenstein M.S. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers // J. Exp. Med. — 129. — P. 1367—1384.

- [2] Аллилуев А.П., Яшина Н.В., Котельникова О.В., Харитоновна А.В. и др. Полимерные окрашенные микросферы для индикации антител к капсульным полисахаридам различных серогрупп менингококков // Биомедицинские технологии. — 1996. — № 4. — С. 77—81.
- [3] Severin W.P.J. Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis // J. Clin. Path. — 1972. — 25. — P. 1079—1082.
- [4] Leinonen M., Herba E. The latex agglutination test for the diagnosis of meningococcal and Haemophilus influenzae meningitis // Scand. J. Infect. Dis. — 1997. — 9. — P. 187—191.
- [5] Requejo H.I.Z., Nascimento C.M.P.C., Fahrat C.K. Comparison of counterimmunoelectrophoresis, latex agglutination and bacterial culture for the diagnosis of bacterial meningitis using urine, serum and cerebrospinal fluid samples // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1992. — 25. — P. 357—367.
- [6] Goldschneider, I; Gotschlich, E C; Artenstein, M S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies // J Exp Med. — 1969. — Jun 1;129 (6). — P. 1307—26.
- [7] Haimanot R.T., Caugant D.A., Fekadu D. et al. Characteristics of serogroup A Neisseria meningitidis responsible for an epidemic in Ethiopia, 1988—89 // Scand J Infect Dis. — 1990. — 22 (2). — P. 171—4.
- [8] Frasch C.E. 1995. Meningococcal vaccines: past, present and future, p. 245—283. In K. Cartwright (ed.), Meningococcal disease. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- [9] Аллилуев А.П., Королева И.С., Венгеров Ю.Я. и др. Реакция латекс-агглютинации для экстренной и ретроспективной диагностики менингококковой инфекции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 128. — № 11. — С. 541—544.
- [10] Харитоновна А.В., Аллилуев А.П., Харт С.А. Выявление уровней антител к капсульным полисахаридам менингококков разработанными ACW 135, AC и A латексными диагностикумами в сыворотках населения Эфиопии // Вестник РУДН, сер. Медицина. — 2007. — № 2. — С. 37—42.

STUDYING DEPENDENCE LEVELS OF THE ANTIBODIES TO CAPSULAR POLYSACCHARIDES OF MENINGOCOCCUS REVEALING BY DEVELOPED ACYW135, AC AND A LATEX DIAGNOSTICS IN THE SERA OF ETHIOPIA POPULATION

A.V. Kharitonova, A.P Alliluev

Department microbiology, virology and immunology
Medical faculty
Peoples Friendship University of Russia
M-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

C.A. Hart

Department of Medical Microbiology and Genito-Urinary Medicine
University of Liverpool
Liverpool, Duncan Building, Daulby Street L69 3GA, United Kingdom

A total of 192 samples of serum of Ethiopia population were examined in order to determine the dependence levels of antimeningococcal antibodies detection by ACYW135, AC and A meningococcal latex diagnostics from age. The most high titer was demonstrated in age group 20—24 years. The obtained data confirmed the diagnostic value of latex diagnostics based on groupspecific polysaccharides and revealed high level of antibodies, that according after epidemical period 2003 year.