

УДК 616-002.151-022.6-078

О. О. Юрченко¹, наук. співроб., **Ю. А. Бощенко**¹, канд. мед. наук,
доц., директор, **О. С. Владико**² д-р мед. наук, зав. відділом

¹ Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І. І. Мечникова,
вул. Церковна, 2/4, Одеса, 65003, Україна,
e-mail: oksyurch@ukr.net

² НДІ епідеміології і мікробіології МОЗ Республіки Білорусь,
вул. К. Цеткін, 4, Мінськ, 220050, Білорусь

ПЕРЕХРЕСНА ІМУНОРЕАКТИВНІСТЬ У ОСОБЛИВО НЕБЕЗПЕЧНИХ ВІРУСІВ ЛАССА, МАРБУРГ І ЕБОЛА

У сироватках хворих на малярію методами непрямой імунофлюоресценції і твердофазного імуноферментного аналізу виявлені антитіла, що специфічно реагують із антигенами вірусів Ласса, Марбург і Ебола. При дослідженні методом імуного блотингу показана локалізація спільних для збудника малярії і вірусу Ласса антигенних детермінант у білка NP вірусу Ласса. На основі порівняльного комп'ютерного аналізу амінокислотних послідовностей в області 122—129 і 154—161 амінокислотних залишків білків NP вірусів Ласса і Ебола ідентифікований один із спільних антигенних сайтів.

Ключові слова: вірусні геморагічні лихоманки Ласса, Марбург і Ебола, діагностика, перехресна реактивність.

Вірусні геморагічні лихоманки Ласса, Марбург і Ебола є високо контагіозними захворюваннями людини. Вони характеризуються важким перебігом і високою летальністю. Тому специфічна лабораторна діагностика цих інфекцій має велике значення як для стратегії відповідного лікування, так і для організації профілактичних і протиепідемічних заходів.

Разом з тим, фахівці в галузі лабораторної діагностики неодноразово зіштовхуються з так званими "хибнопозитивними" реакціями. Однією з причин їхнього виникнення є здатність збудників різних захворювань індукувати утворення перехресно реагуючих антитіл внаслідок наявності в їхньому складі спільних антигенних детермінант. Так, у 1990 р. J. Khalife із співавт. і F. E. G. Cox опублікували результати, що стосуються виявлення ідентичних антигенних структур у філогенетично віддалених представників біологічного світу — гельмінта *Shistosoma mansoni* і вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) [1, 2]. W. R. Mackenzie із співавт. (1992) при вивченні напруженості поствакцинного імунітету, сформованого після імунізації людей корпускулярою убитою протигрипозною вакциною, знайшли в сироватках обстежених осіб, крім антигрипозних антитіл, антитіла до вірусів гепатиту С, ВІЛ і HTLV-1 [3]. Сероконверсія до ВІЛ була виявлена після вакцинації проти гепатиту В [4].

Раніше було показано, що сироватки хворих малярією реагують одночасно з антигенами вірусів високо контагіозних лихоманок Ласса, Марбург і Ебола [5]. Тому метою даної роботи є серологічний і біохімічний доказ існування спільних антигенних детермінант у вірусів, що представляють різні родини: *Filoviridae* (Ебола) і *Arenaviridae* (Ласса).

Матеріали і методи

У роботі використовували віруси Ласса (штам *Josiah*), Марбург (штам *Voege*) і Ебола (*Zaire*, штам *Maying*), отримані від доктора G. van der Groen (Інститут тропічної медицини, Антверпен, Бельгія).

Віруси були клоновані тричі з бляшки в бляшку на клітинах Vero, а потім розмножені на клітинах ВНК-21 чи Vero. Титри клонованих стандартних вірусів складали $2-7 \cdot 10^6$ БУО/мл.

Накопичення вірусів і визначення їхньої інфекційної активності здійснювали за методикою, описаною раніше [6]. Вірус концентрували та очищали методами [7, 8] і використовували як антиген для твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА).

Як референс використовували сироватки реконвалесцентів: до вірусу Ласса — № 095312 (люб'язно надана G. van der Groen, Інститут тропічної медицини, Антверпен, Бельгія), до вірусу Марбург — № 700808 і до вірусу Ебола — № 096023 (люб'язно надані D. McCormick, Центр з контролю за інфекційними захворюваннями, Атланта, США).

Твердофазний імуноферментний аналіз провадили за раніше описаним методом [9].

Клітини, які містили антиген, (слайди) для проведення тесту непрямої імунофлюоресценції (РНІФ) готували за методом H. Wulff із співавт. [10]. Сироватки перед проведенням РНІФ розводили (1:16) фосфатно-сольовим буфером.

Імуноблотинг провадили за методом H. Towbin із співавт. [11].

Комп'ютерну обробку амінокислотних послідовностей білків NP вірусів Ласса [12] і Ебола [13] здійснювали за допомогою програми "DNAsis" [14, 15].

Результати досліджень та їх обговорення

Сироватки, отримані від хворих на малярію, були тестовані на наявність антитіл до тропічних вірусних геморагічних лихоманок Ласса, Марбург і Ебола шляхом реакції непрямої імунофлюоресценції (РНІФ) і твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА). Всього було тестовано 36 сироваток. У 14 з них містилися специфічні антитіла щонайменше до одного антигену: 3 сироватки реагували з одним вірусним антигеном, 3 — з двома и 8 — з трьома. При цьому сироватка 1754 прореагувала з усіма трьома антигенами при аналізі методами РНІФ і ТІФА. Саме тому у подальшому вона була використана

для визначення титру антитіл у РНІФ з антигенами вірусів Ласса, Марбург і Ебола. Виявилось, що титри антитіл до вірусу Ласса в сироватці склали 1 : 512, до вірусу Марбург — 1 : 256, а до вірусу Ебола — 1 : 64. Сироватка 1754 давала світіння з антигенами вірусів Ласса, Марбург і Ебола аналогічне світінню, що спостерігалось з моноспецифічними референс-сироватками і не реагувала з нормальними неінфікованими клітинами.

Можна припустити, що збудник малярії індукує у людини клон (клони) антитіл, які перехресно реагують з арена- і філовірусами і що збудник малярії і дані віруси мають спільні антигенні детермінанти. З метою доказу цього було зроблено спробу локалізувати з використанням антитіл до збудника малярії (сироватка 1754) спільний антигенний сайт на рівні вірусних білків. Дослідження провадили з вірусом Ласса методом імунного блотингу (ІБ). Було показано, що сироватка 1754 зв'язувалася з білком NP вірусу Ласса, тоді як у контрольних зразках специфічна до вірусу Ласса сироватка зв'язувалася з структурними білками NP і GP2, а нормальна сироватка з вірусними білками не реагувала. Виходячи з даних ІБ, можна зробити висновок, що спільний антигенний сайт для збудника малярії і вірусу Ласса локалізований у нуклеопротеїні вірусу Ласа.

Це припущення підтверджується результатами порівняльного комп'ютерного аналізу амінокислотних послідовностей білків NP вірусів Ласса і Ебола. З рисунку 1 видно, що у вірусу Ласса в області 122—129, а у вірусу Ебола — 154—161 амінокислотних залишків є високий ступінь гомології, обумовлений консервативними амінокислотними замінами, розташованими в ідентичних гідрофільних зонах.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють зробити висновки про те, що в деяких випадках так звані "хибнопозитивні" реакції пов'язані із здатністю збудників різних видів (і навіть тих, що відносяться до різних царств живої природи) індукувати синтез перехресно реагуючих антитіл. Окрім того, показано, що віруси Ласса і Ебола, котрі відносяться до різних родин (*Arenaviridae* і *Filoviridae*) містять спільні антигенні детермінанти. Частина із спільних антигенних детермінант локалізується в білках нуклеопротеїнів (NP) вірусів. Показано, що один із спільних антигенних сайтів розташований в області 122—129 і 154—161 амінокислотних залишків білків NP вірусів Ласса і Ебола відповідно.

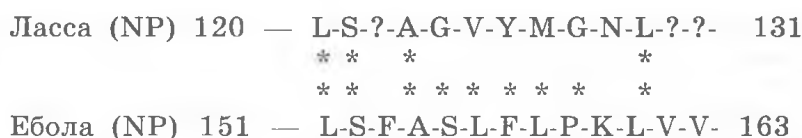


Рис. 1. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків NP вірусів Ласса і Ебола

Примітка: L — лейцин, S — серин, A — аланін, G — гліцин, V — валін, Y — тирозин, M — метіонін, N — аспарагін, F — фенілаланін, P — пролін, K — лізін. Одна зірочка — консервативні амінокислотні заміни, дві зірочки — гомологічні амінокислоти

З урахуванням висловленої гіпотези і на підставі проведених нами досліджень, можливо, у майбутньому буде запропоновано новий підхід щодо удосконалення серологічних методів діагностики лихоманок Ласса і Ебола шляхом виключення перехресно реагуючих антигенних детермінант із складу діагностичних імунобіологічних препаратів і підвищення їх специфічності. Згодом такий підхід може бути використаний для вдосконалення діагностики інших інфекцій, що свідчить про загальбіологічне значення проведених досліджень.

Висновки

1. При дослідженні методами непрямой імунофлюоресценції і твердофазного імуноферментного аналізу сироваток крові хворих на малярію виявлено антитіла, що реагують з антигенами вірусів Ласса, Марбург і Ебола.
2. За допомогою імуного блотингу показано, що спільні для збудників малярії і лихоманки Ласса антигенні детермінанти локалізовані у білку NP вірусу Ласса.
3. Порівняльний комп'ютерний аналіз амінокислотних послідовностей виявив один із спільних антигенних сайтів, розташований в області 122—129 і 154—161 амінокислотних залишків білків NP вірусів Ласса і Ебола, що належать до різних родин вірусів.

Література

1. Khalife J., Grzych J. M., Pierce R. et al. Capron A immunological crossreactivity between the human immunodeficiency virus type 1 virion infectivity factor and a 170 kD surface antigen of *Schistosoma mansoni* // *J. exp. Med.* — 1990. — Vol. 172. — P. 1001—1004.
2. Cox F. E. G. The worm and the virus // *Nature.* — 1990. — Vol. 347. — P. 618.
3. Mackenzie W. R., Davis J. P., Peterson D. E. et al. Multiple false-positive serologic tests for HIV, HTLV-1 and hepatitis-C following influenza vaccination, 1991 // *J. Amer. med. Assoc.* — 1992. — Vol. 268. — P. 1015—1017.
4. Lee D. A., Eby W. C., Molinaro G. A. HIV false positivity after hepatitis B vaccination // *Lancet.* — 1992. — № 339. — P. 1060.
5. Vladyko A. S., Zajtseva V. N., Maryankova R. F., Petkevich A. S. Malaria patient serum cross-reacts with Lassa, Marburg and Ebola viruses // 8th International Congress of Immunology. — Budapest (Hungary). — 1992. — P. 520.
6. Лукашевич И. С., Марьянкова Р. Ф., Петкевич А. С. и др. Накопление некоторых аренавирусов в перевиваемых клетках Vero и ВНК-21 // *Вопр. вирусол.* — 1981. — № 2. — С. 164—168.
7. Лукашевич И. С., Стельмах Т. А., Голубев В. П., Вотьяков В. И. Седиментационный и электрофоретический анализ геномных РНК патогенных аренавирусов // *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.* — 1984. — № 1. — С. 21—24.
8. Lukashevich I. S., Stelmakh T. A., Golubev V. P. et al. Ribonucleic acid of Machupo and Lassa viruses // *Arch. virol.* — 1984. — Vol. 79. — P. 189—203.
9. Иванов А. П., Ткаченко Е. А., ван дер Гроен и др. Непрямой иммуноферментный метод для лабораторной диагностики геморрагических лихорадок Ласса и Ебола // *Вопр. вирусол.* — 1986. — № 2. — С. 186—190.
10. Wulff H., Lange J. V., Webb P. A. Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence // *Intervirology.* — 1978. — Vol. 9. — P. 344—350.

11. *Towbin H., Stachelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
12. *Auperin D. D., McCormick J. B.* Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino-acid sequence comparison of the N and GPS proteins to other arenaviruses // *Virology.* — 1989. — Vol. 168. — P. 421—425.
13. *Sanchez A., Kiley M. P., Holloway B. P.* et al. The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning sequencing, and in vitro expression // *Virology.* — 1989. — Vol. 170. — P. 81-91.
14. *Chou P. Y., Fasman G. D.* Empirical predictions of protein conformation // *Ann. Rev. Biochem.* — 1978. — Vol. 47. — P. 251—276.
15. *Hu X. M., Wu H. W., Zhang Z. S.* et al. Analysis of the mitochondria-related protein of *Schistosoma japonicum* and its antigen epitopes // *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* — 2001. — Vol. 19. — P. 19—21.

О. А. Юрченко, Ю. А. Бощенко, А. С. Владыко

Украинский научно-исследовательский противочумный институт
им. И. И. Мечникова
ул. Церковная, 2/4, Одесса, 65003, Украина

НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь
ул. К. Цеткин, 4, Минск, 220050, Беларусь

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ИММУНОРЕКТИВНОСТЬ СРЕДИ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСОВ ЛАССА, МАРБУРГ И ЭБОЛА

Резюме

В сыворотках больных малярией методами непрямой иммунофлюоресценции и твердофазного иммуноферментного анализа выявлены антитела, специфически реагирующие с антигенами вирусов Ласса, Марбург и Эбола. При исследовании методом иммунного блоттинга показана локализация общих для возбудителя малярии и вируса Ласса антигенных детерминант в белке NP вируса Ласса. На основе сравнительного компьютерного анализа аминокислотных последовательностей в области 122—129 и 154—161 аминокислотных остатков белков NP вирусов Ласса и Эбола идентифицирован один из общих антигенных сайтов.

Ключевые слова: вирусные геморрагические лихорадки Ласса, Марбург и Эбола, диагностика, перекрестная реактивность.

O. A. Yurchenko, Y. A. Boshchenko, A. S. Vladyko

Ukrainian Mechnikov Research Antiplague Institute
Zerkovnaya St., 2/4, Odessa, 65003, Ukraine

Research Institute of Epidemiology and Microbiology
K. Zetkin St., 4, Minsk, 220050, Belarus

CROSS-IMMUNOREACTIVITY AMONG LASSA, MARBURG AND EBOLA ESPECIALLY DANGEROUS VIRUSES

Summary

Specifically reacting antibodies with the antigenes of Lassa, Marburg and Ebola viruses were found into sera of patients with malaria by indirect immunofluorescence

technique and enzyme-linked immunosorbent assay. Localization of the common antigenic determinants for the malaria agent and Lassa virus is shown in NP protein of Lassa virus by Western blot technique. One of the common antigenic sites is identified in the field of 122—129 and 154—161 aminoacid rests of Lassa and Ebola viruses NP proteins by the comparative computer analysis of aminoacid sequences.

Keywords: Lassa, Marburg and Ebola hemorrhagic fevers, diagnostics, cross-reactivity.