

Оленькова О.М.¹, Ковтун О.П.², Сабитов А.У.²,
Субботина Н.С.¹, Сбитнева Н.Н.¹, Бейкин Я.Б.¹

Диагностика энтеровирусных инфекций у детей г.Екатеринбурга

1 - МБУ «Клинико-диагностический центр», г.Екатеринбург; 2 - ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург

Olenkova O.M., Kovtun O.P., Sabitov A. U., Subbotina N.S., Sbitneva N.N., Beykin J.B.

Diagnosics of enteroviral infections among children in Yekaterinburg city

Резюме

В работе проведена оценка результатов лабораторного обследования 2066 детей с диагнозом ЭВИ, менингеальная форма. Для вирусологических исследований в работу были взяты носоглоточные смывы и 2-3 пробы фекалий. У 960 детей были проведены серологические исследования. Парные сыворотки были изучены в реакции нейтрализации (РН) с эталонными штаммами вирусов Коксаки В1, Коксаки В2 и Коксаки В3 и в РН с аутоштаммами. Кроме того, пробы ликвора от 1044 человек исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В результате проведенного обследования определены ведущие этиологические агенты в период с 2003 по 2009 гг., которыми явились вирусы Коксаки В и ЕСНО. При сравнении результатов вирусологического, серологического и молекулярно-биологического методов показана необходимость комплексного обследования пациентов для установления и подтверждения диагноза.

Ключевые слова: энтеровирусы, ПЦР, вирусологические и серологические методы

Summary

In this study we analyzed the results of laboratory tests for 2066 children with diagnosis of enteroviral infection in its meningitis form (aseptic meningitis). For virological research, a nose and throat swab, and two or three stool specimens were taken. Serological tests were done for 960 children. Seroconversion was assessed in neutralization assays (NA) with Coxsackie virus B1, Coxsackie B2 and Coxsackie B3 reference strains and in NA with isolates from patients (autostrains). In addition, 1044 samples of cerebrospinal fluid (CSF) were tested using polymerase chain reaction (PCR). It was determined that Coxsackie B and ECHO viruses were the main etiological agents during the period from 2003 to 2009. Establishment and verification of the diagnosis required comprehensive approach to the comparison of the results obtained by virological, serological and molecular biological methods.

Keywords: enteroviruses, PCR, virological and serological methods

Введение

Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) – это группа антропонозных вирусных заболеваний преимущественно с фекально-оральным механизмом передачи, характеризующиеся поражением желудочно-кишечного тракта (гастроэнтерит), нервной системы (серозный менингит, менингит, энцефалит), мышц и миокарда (эпидемическая миалгия, миокардиты и перикардиты), слизистых (герпангина, острый катар дыхательных путей, геморрагический конъюнктивит) и кожи (инфекционная экзантема) [1].

По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Федерального центра гигиены и эпидемиологии, абсолютное число заболевших в России в 2010 году составило 4154 человека, из них энтеровирусным

менингитом - 2013 человек. Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения при этом составил 2,93 и 1,44, соответственно [2]. В сравнении с 2009 годом (в 2009 году показатель заболеваемости ЭВИ составил 4,74, а серозными менингитами - 2,99), вышеназванные показатели снизились. Однако, за последние годы зарегистрировано большое количество вспышек в разных странах мира (Англии, Уэльсе, Бельгии, Испании, Германии, Японии, России) [3].

Различные серотипы энтеровирусов способствуют возникновению заболеваний со сходными клиническими проявлениями, вирус одного серотипа может быть выделен от больных с разной формой инфекции.

Широкое распространение, большое количество серотипов и клинических форм инфекции вызывает все больший интерес к ЭВИ как в медицине и эпидемиоло-

гин, так и в вирусологии и молекулярной биологии [4].

Цель исследования - проанализировать результаты обследования детей с диагнозом ЭВИ, менингеальная форма и изучить при помощи разных методов лабораторной диагностики (вирусологических, серологических и молекулярно-биологических) циркуляцию непoliомиелитных энтеровирусов в г. Екатеринбург в период с 2003 по 2009 гг.

Материалы и методы

В лабораторию вирусологии МБУ «Клинико-диагностический центр» в период с 2003 по 2009 гг. поступил клинический материал от 2066 детей, которые были пациентами инфекционного отделения ГКБ№ 40 г. Екатеринбург с диагнозом ЭВИ, менингеальная форма.

Лабораторное обследование и интерпретация результатов проводили согласно методическим указаниям «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции». Для вирусологических исследований в работу были взяты носоглоточные смывы, пробы фекалий, для серологических исследований - парные сыворотки крови, взятые при поступлении детей в отделения стационара и с интервалом 14-21 день, для ПЦР- исследований - ликвор.

Энтеровирусы выделяли, используя метод заражения перевиваемых клеточных линий, при котором присутствие вируса в пробе инфекционного материала вызывает дегенерацию клеток. В исследованиях использовали три вида клеточных линий: RD (линия клеток, полученная из рабдомиосаркомы человека), Нер-2 (культура клеток, полученная из эпидермоидной карциномы человека) и L20В (культура клеток, созданная на основе мышинной линии L-клеток), которые были получены из Регионального центра эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Свердловской области Роспотребнадзора).

Изоляты были идентифицированы с помощью стандартных специфических сывороток производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН им. М. П. Чумакова. Вируснейтрализующие антитела определяли в реакции нейтрализации (РН) с ауштаммами и эталонными штаммами вирусов Коксаки

В1, Коксаки В3 и Коксаки В5 (микрометод).

Кроме того, материал от 1104 человек был обследован методом полимеразной цепной реакции. С помощью ПЦР были исследованы пробы ликвора, которые были получены от пациентов в первые дни болезни.

Выделение РНК энтеровирусов из ликвора выполняли методом аффинной сорбции на частицах силикагеля с использованием наборов «РИБО-сорб» (производства ФГУН ЦНИИЭ, Москва). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием наборов «Реверта-L» указанного производителя. Реакцию амплификации проводили на термоциклере Терцик («ДНК-Технология») и GeneAmp-2400 (Applied Biosystems) с последующей детекцией продуктов амплификации (специфических участков кДНК) методом гель-электрофореза с применением диагностических наборов «АмплиСенс Энтеровирусы» (производство ФГУН ЦНИИЭ, Москва).

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica for Windows Version 5.0 (Stat Soft Inc., США).

Результаты и обсуждение

При оценке количества вирусовывделителей можно отметить видимый рост данного показателя: если в 2003 году количество вирусовывделителей составило 49 человек, что соответствует 24,02% от числа обследованных в этот год, то в 2009 году количество вирусовывделителей было 135 человек (52,53%). Наблюдается тенденция волнообразного роста удельного веса вирусовывделителей, а именно незначительное снижение показателя в 2004 году сменялось еще большим его увеличением; аналогичная картина отмечена в 2007 и 2008 гг. (рисунок 1).

В период с 2003 по 2009 гг. были выделены различные типы/серотипы энтеровирусов (ЭВ), такие как ЕСНО 6, ЕСНО 7, ЕСНО 11, ЕСНО 30, Коксаки В1, Коксаки В3, Коксаки В4 и Коксаки В5. Отмечены единичные определения вирусов ЕСНО 2, ЕСНО 16, ЕСНО 17, ЕСНО 20, а также миксты – ЕСНО + Полиовирус, ЕСНО +Коксаки В, ЕСНО 19+24.

При анализе динамики выделения вирусов ЕСНО

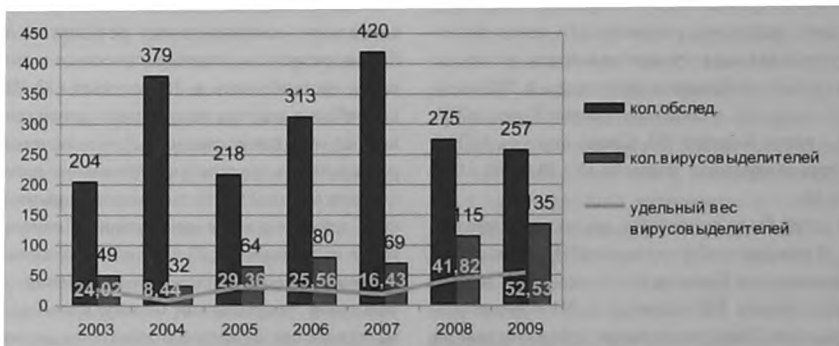


Рисунок 1. Количество обследованных и удельный вес вирусывделителей 2003 - 2009 гг.

Таблица 1. Результаты вирусологического обследования детей г.Екатеринбурга

Год	Кол-во обслед.	Кол-во вирусывыделит.		ЕСНО		Коксаки В		н/т ЦПА		Полиомир.		Микст	
		абс	отн	абс	отн	абс	отн	абс	отн	абс	отн	абс	отн
2003	204	49	24,02	9	18,5	38	77,5	1	2			1	2
2004	379	32	8,44	2	6,25	14	43,75	14	43,8	1	3,12	1	3,12
2005	218	64	29,36	-	-	55	85,94	6	9,36	1	1,57	2	3,13
2006	313	80	25,56	1	1,25	65	81,3	13	16,2	1	1,25		
2007	420	69	16,43	2	2,9	63	91,3	4	5,8				
2008	275	115	41,82	97	84,35	7	6,1	10	8,7	1	0,85		
2009	257	135	52,53	105	77,8	12	8,9	17	11,95			1	0,7
Итого	2066	544	26,33	216	39,7	254	46,7	65	12	4	0,73	5	0,92

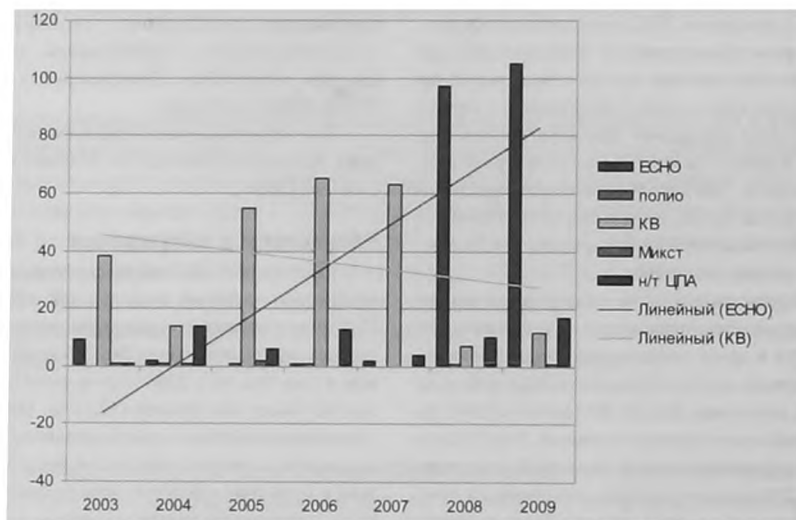


Рисунок 2. Типы выделенных энтеровирусов в 2003 - 2009 гг.

и Коксаки В видно, что в 2003-2007 гг. лидирующее место среди выделенных вирусов имели вирусы Коксаки В. Удельный вес этих вирусов в названный период колебался от 43,75% до 85,94%. Начиная с 2008 года, ведущее место занимали вирусы ЕСНО, когда их удельный вес составлял 84,35% (2008 г) и 77,8% (2009 г) (Таблица 1). В период с 2003 по 2009 гг. наблюдали тенденцию снижения выделения Коксаки В и увеличения выделения вирусов ЕСНО (рисунок 2).

При более детальном рассмотрении типов выделенных вирусов в разные годы можно сказать, что среди вирусов Коксаки В наибольшую значимость в 2005 году имел вирус Коксаки В5, в 2006 году – вирус Коксаки В2, в 2007 году - вирус Коксаки В3. Среди вирусов ЕСНО особый интерес заслуживал вирус ЕСНО 30 (2008-2009 гг.) (рисунок 3).

У 960 детей были проведены серологические исследования. В реакции нейтрализации (РН) с эталонными штаммами вирусов Коксаки В1, Коксаки В3 и Коксаки В5 обследовано 872 человека, в РН с аутоштаммами - 327 человек. Увеличение титра нейтрализующих антител в 4 и более раз в РН с эталонными штаммами наблюдали в 12,4% случаев. Более значимые показате-

ли были определены в РН с аутоштаммами: диагностическое нарастание титра антител выявили в 52,6%, что подтверждает инфицирование больных энтеровирусами.

Помимо вирусологических и серологических исследований ликвор от 1104 пациентов был обследован в ПЦР. Положительные результаты были получены у 904 человек (81,8%). Однако выделение вируса у этих же детей было возможным лишь в 37%. Полное совпадение положительных результатов молекулярно-биологического и вирусологического методов исследования установлено в 357 случаях (32,3%). Для более подробного анализа полученных результатов вышеназванных методов исследований все обследованные были разделены на группы, основными из которых являются следующие: 1) дети с положительными результатами вирусологического и молекулярно-биологического методов исследований; 2) лица с положительными результатами вирусологических исследований, но с отрицательными результатами молекулярно-биологического исследования; 3) дети с отрицательным результатом по вирусологии, но положительным результатом в ПЦР; 4) пациенты с отрицательными результатами в обоих мето-

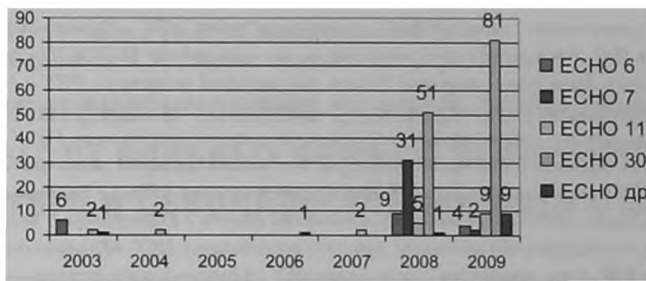


Рисунок 3а. Типы вирусов ЕСНО, выделенные в 2003-2009 гг.

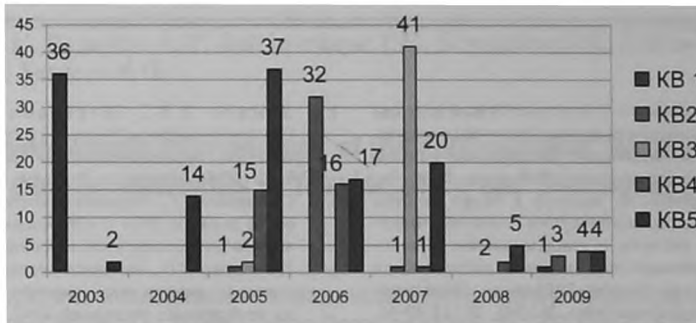


Рисунок 3б. Типы вирусов Коксаки В, выделенные в 2003-2009 гг.

дах; 5) дети, у которых был выявлен не типизируемый цитопатогенный агент (н/т ЦПА) и положительный результат в ПЦР и 6) дети, у которых был выявлен н/т ЦПА и отрицательный результат в ПЦР. Всем больным были проведены РН с аутоштаммами (кроме групп с отрицательным вирусологическим результатом) и РН с эталонными штаммами вирусов Коксаки В. Особый интерес заслуживают результаты РН с аутоштаммом (таблица 2).

При положительных результатах вирусологического и молекулярно-биологического исследований количество пациентов с диагностическим нарастанием титра вируснейтрализующих антител (увеличение титра в 4 и более раз) к аутоштаммам составило 146 человек (54,8%). В данном случае можно сделать вывод о том, что результаты ПЦР-диагностики, вирусологического и серологического методов исследования полностью коррелируют между собой и дополняют друг друга.

Количество проб с положительным результатом вирусологического и отрицательным результатом молекулярно-биологического исследования было незначительным. Однако, можно предположить, что в данном случае не стоит полагаться лишь на результаты ПЦР-диагностики, т.к. при проведении РН с аутоштаммом удельный вес лиц с увеличением титра антител составил 34,4%, что является достаточно высоким показателем, а значит нельзя исключать наличия энтеровирусной инфекции.

При анализе результатов с н/т ЦПА количество пациентов с 4-х кратным и более увеличением титров антител было больше половины обследуемых, что также не исключает возможность присутствия у детей энтеровирусной инфекции.

Таким образом, многолетнее изучение этиологии энтеровирусной инфекции при помощи разных методов лабораторной диагностики показало, что имела активная циркуляция представителей семейства энтеровирусов. По официальным данным, в России кривая заболеваемости ЭВИ имеет волнообразное течение [5]. Аналогичные результаты показаны и в наших исследованиях. Лидирующее место среди этиологических агентов ЭВИ занимали вирусы Коксаки В и вирусы ЕСНО. Наибольшее количество из вирусов Коксаки В составил Коксаки В5 (выделение вируса отмечено ежегодно с пиком выделяемости в 2005 г.), KB4 (выделение вируса было ежегодно с 2005 по 2009 гг.) и KB3 (выделяли в 2007 г.). Из большого числа серотипов вирусов ЕСНО, выделение которых отмечено на протяжении всего анализируемого периода, обращает на себя внимание вирус ЕСНО 30 (максимальное количество штаммов ЕСНО 30 выделено в 2008-2009 гг.).

Несмотря на то что современные методы лабораторной диагностики, такие, как полимеразная цепная реакция, обладают рядом преимуществ (высокая специфичность, чувствительность и быстрота исполнения) [6], нельзя отказываться от классических, давно известных способов диагностики, а именно способа выделения и идентификации энтеровирусов с использованием культур чувствительных клеток, которые являются «золотым стандартом» лабораторной диагностики ЭВИ [7]. ПЦР-исследование можно использовать в качестве метода экспресс-диагностики ЭВИ. Окончательный лабораторный диагноз, вероятно, необходимо подтверждать результатами культуральных и серологических исследований. ■

Оленькова О.М., заведующая лабораторией вирусологии, врач МБУ «Клинико-диагностический центр» г.Екатеринбург; Ковтун О.П., д.м.н., профессор, проректор по научной работе ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, зав.кафедрой педиатрии ФПК и ПП ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург; Сабитов А.У., д.м.н., профессор, зав.кафедрой детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, зав.кафедрой педиатрии ФПК и ПП ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург; Субботина Н.С., врач лаборатории вирусологии МБУ «Клинико-диагностический центр» г.Екатеринбург; Сбитнева Н.Н., к.б.н., заведующая лабораторией молекулярно-биологических методов исследования МБУ «Клинико-диагностический центр» г.Екатеринбург; Бейкин Я.Б., д.м.н., профессор, главный врач МБУ «Клинико-диагностический центр» г.Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Оленькова О.М., г. Екатеринбург, МБУ «Клинико-диагностический центр», заведующая лабораторией вирусологии, тел. (343)257-71-37, 8-902-8718174, e-mail: dcldivir@mail.ru

Литература:

1. Шкарин В.В., Никифоров В.А. и соавт. Новые подходы к проблеме профилактики острых кишечных инфекций с диарейным синдромом в специальных и особо организованных коллективах. Н.Новгород, 2006.
2. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Федеральный центр гигиены и эпидемиологии. «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях (Форма 1) за январь-декабрь 2010 года». Эпидемиология и вакцинопрофилактика. №1(56), 2011, с.40-41.
3. Лукашев А.Н., Резник В.И. и соавт. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 6 – возбудителя вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. Вопросы вирусологии, 2008, №1, с.16.
4. Демина А.В., Маркович Н.А., Нетесов С.В. Энтеновирусы. Часть 1: История открытия, таксономия, строение генома, эпидемиология, Бюллетень СО РАМН. 2008, № 1(129), с.92.
5. Онищенко Г.Г., Решение коллегии Роспотребнадзора от 24 декабря 2009 г. «Об эпидемиологическом надзоре за энтеровирусной инфекцией».
6. Кишкурно Е.П., Энтеровирусная инфекция у детей: клиника, диагностика, подходы к терапии, Медицина неотложных состояний. 2007, №2(9).
7. Голицина Л.Н., Новикова Н.А., Домбровская Л.К. и соавт., Оценка разработанного «nested»- варианта полимеразной цепной реакции при выявлении энтеровирусов у больных. Вопросы вирусологии, 2002, №5, с.41.