

## СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМИЕЛИТА

Е.А. Мурина, О.В. Голева, З.А. Осипова, А.Л. Мукомолова

*Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия*

### Modern possibilities of virological diagnostics of poliomyelitis

E.A. Murina, O.V. Goleva, Z.A. Osipova, A.L. Mukomolova

Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

#### Резюме

*В обзоре представлены данные иностранной и отечественной литературы, посвященные современной вирусологической диагностике полиомиелитных вирусов 1, 2 и 3 типов, что особенно актуально в связи с программой ВОЗ о полной ликвидации полиомиелита в мире. Показана роль лабораторных вирусологических исследований в постановке диагноза полиомиелитной инфекции. Достаточно подробно рассматриваются классические методы обнаружения полиомиелитных вирусов.*

**Ключевые слова:** вирус полиомиелита, энтеровирусы, методы вирусологической диагностики, идентификация полиовируса.

#### Введение

Полиомиелит (poliomyelitis) — это острая энтеровирусная инфекция, которая в ряде случаев характеризуется повреждением серого вещества спинного мозга и различных отделов ЦНС с развитием вялых атрофических параличей и парезов мышц, поражением слизистой оболочки кишечника и носоглотки. Полиомиелит относится к острым вирусным инфекциям, обладающим высокой контагиозностью. Источником инфекции являются больные люди и вирусоносители, поскольку человек — это единственный хозяин вируса полиомиелита. После попадания в организм человека вирус полиомиелита размножается в слизистой оболочке и лимфоидных образованиях ротоглотки и кишечника. Длительность инкубационного периода может колебаться от 3 до 35 дней, в среднем он равен 7–21 дню. Возможна и транзитная вирусемия при размножении вируса в ретикулоэндотелиальной системе. Выделение вируса начинается на 2–4-й день после инфицирования и продолжается из ротоглотки несколько дней, с фекалиями — 4–7 недель, после чего вирус может полностью элиминироваться из организма. Период размножения вируса может протекать бессимптомно или сопровождаться субфебрильной температурой без других клинических проявлений. Вирус полиомиелита проникает в кишечник, размножается на

#### Abstract

*The review presents the data from the literature of our and foreign countries devoted to modern virologic diagnostics of poliomyelitis viruses of 1, 2, and 3 types that is especially topical in connection with WHO program on complete poliomyelitis elimination in the world. There is described the role of laboratory virologic investigations in making the diagnosis of poliomyelitis infection. The classical methods of poliomyelitis viruses detection are given in detail.*

**Key words:** virus of poliomyelitis, enteroviruses, methods of virological diagnosis, identification of poliovirus.

слизистых кишечника, затем проникает в кишечные лимфатические узлы и из них в кровь. Дальнейшее размножение вируса сопровождается постоянной вирусемией, в редких случаях (1%) вирус преодолевает гематоэнцефалический барьер и достигает нервных клеток. Он проникает во все органы и системы, преимущественно в спинной мозг, поражая его на разных уровнях. Вирус полиомиелита размножается в центральной нервной системе, преимущественно в двигательных нейронах передних рогов спинного мозга. Реже поражения наблюдаются в двигательных ядрах черепно-мозговых нервов ствола, ретикулярной формации покрышки ствола, черном веществе, в ядрах покрышки среднего мозга, сером веществе, окружающем сильвиев водопровод, паравентрикулярных областях, промежуточном мозге и передних извилинах головного мозга. Размножение вирусов полиомиелита происходит в нервных клетках, что приводит к гибели нейронов. Параллельно с развитием поражений спинного и головного мозга закономерно возникают изменения в их оболочках. Поражение нервной системы достигают максимума к четвертому дню болезни. При повреждении более одной трети нервных клеток развиваются вялые параличи тех мышц, которые иннервируются пораженным участком нервной системы. Острые вялые параличи, чаще всего асимметричные параличи

нижних конечностей, являются характерными для клинической картины заболевания. Поражение центральной нервной системы, например центра контроля дыхательной системы, может привести к остановке дыхания и к смерти. Общие клинические проявления развиваются примерно у 5% зараженных вирусом полиомиелита, а паралитические формы составляют не более 1%. Нейровирулентность вируса полиомиелита не оказывает большого влияния на распространение инфекции среди людей. Поражение нервной системы — явление редкое, паралитический полиомиелит развивается примерно в 1% случаев инфицирования вирусом полиомиелита. Но во всех случаях инфицирования вирус полиомиелита размножается в эпителии кишечника и выделяется с фекалиями во внешнюю среду, что создает возможности для трансмиссии вируса от человека к человеку. Выделение вируса осуществляется в среднем в течение 30–35 дней после инфицирования, но наиболее активно он выделяется перед развитием паралича и в течение 14–18 дней после появления первых симптомов заболевания. Поскольку основной механизм передачи вируса фекально-оральный, то это и обуславливает его длительное выделение с фекальными массами и высокой концентрацией в них. Вирус размножается в эпителии кишечника и в течение 14–28 дней выделяется с фекалиями в 100% случаев заболевания. Чаще всего передача вируса полиомиелита происходит контактно-бытовым путем [1, 2].

Полиомиелит вызывается тремя антигенными типами вируса полиомиелита — I (Brunhilde), II (Lansing) и III (Leon). Наиболее распространен вирус полиомиелита I типа, вызывающий до 85% всех случаев паралитических форм заболевания и являющийся в 60–90% причиной эпидемий, тогда как II тип обнаруживается в 10–12%, вирус III типа вызывает отдельные спорадические заболевания, а эпидемии возникают лишь в 5–35% случаев.

Полиомиелит на современном этапе отличается полиморфизмом клинических форм — это непаралитические и паралитические формы, характеризующиеся проявлением различной симптоматики. Общие клинические проявления появляются у зараженных вирусом полиомиелита примерно в 5% случаев, а паралитические формы составляют не более 1% [3]. Примерно 10% больных паралитическими формами полиомиелита умирают, а от 40% и выше остаются инвалидами, поскольку инфекция заканчивается остаточными параличами с атрофией мышц. Полное выздоровление от паралитической формы без последствий происходит в 30% случаев, но тогда перенесённое заболевание, видимо, не являлось полиомиелитом, так как в процессе полиомиелитной инфекции паралич возникает в результате гибели мотонейронов при

элиминации вируса из ЦНС. Частичное выздоровление возможно и связано, например, с уходом отёка, которым сопровождалась воспалительная реакция на размножение вируса и иммунную реакцию [4].

Упоминание о случаях полиомиелита постоянно встречается в периодической печати [5], и эта проблема чрезвычайно актуальна на данном этапе, поскольку в 1988 г. на Ассамблее ВОЗ были поставлены задачи искоренения полиомиелита во всем мире к 2000 г. [6, 7], что означает прекращение циркуляции диких вариантов вирусов полиомиелита.

Одной из наиболее важных задач, стоящих перед современной вирусологической наукой, является обнаружение и идентификация вирусов-возбудителей инфекционных заболеваний. Методы вирусологической и серологической диагностики, направленные на обнаружение вирусов полиомиелита на современном этапе, представляют большие трудности, что в первую очередь вызвано редкостью случаев, поскольку в основном это единичные заболевания, а также легким или стертым течением паралитических форм заболевания. Немаловажная роль в трудностях диагностики принадлежит и врачам, в связи с отсутствием эпидемиологической настороженности [2].

#### Характеристика вирусов полиомиелита

Вирус полиомиелита относят к семейству Picornaviridae (от лат. *pico* — маленький, *na* — РНК-содержащий) и роду Enterovirus. Вирусы полиомиелита представлены тремя серотипами. К типовым представителям семейства Picornaviridae и рода Enterovirus относится вирус полиомиелита I типа штамм Mahoney.

Вирусы полиомиелита имеют небольшие размеры (диаметр вириона 25–30 нм) и по праву принадлежат к самым мелким вирусам из всех вирусов, содержащих РНК. Они не имеют липидной оболочки, а высокоструктурированная белковая оболочка состоит из 60 субъединиц, которые формируются из различных четырех полипептидных цепей с расположенным внутри геномом, являющимся одной молекулой РНК. Проникновение вируса в цитоплазму клетки происходит при связывании рецептора вируса полиомиелита и специфического белка цитоплазматической мембраны, что и обуславливает изменения структуры капсида, которые создают необходимые условия для попадания РНК в цитоплазму.

На данный момент исследователями установлено, что темпы эволюции вирусов полиомиелита достаточно высоки, что связано с большой частотой ошибок РНК-полимеразы при репликации РНК. Для вирусов полиомиелита она составляет  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  замен на геном в течение только одного цикла ре-

пликации [8, 9], а для диких и вакцинных штаммов уровень изменчивости составляет 1 замену на сайт в год, но это число не является постоянным. В зависимости от условий передачи, количества инфицированных лиц, плотности их контактов, случаев рекомбинации вируса и др. оно может меняться [10, 11]. Помимо мутаций, эволюция вирусов полиомиелита может быть связана и с молекулярной рекомбинацией, происходящей при введении ребенку оральной полиомиелитной вакцины, состоящей из трех серотипов вирусов полиомиелита. Проведение данной процедуры может привести к образованию межтипных рекомбинантов вакцинных штаммов. Не исключена и возможность образования рекомбинации между вакцинными и дикими штаммами вируса полиомиелита, что вызывает образование внутритипных рекомбинантов [12].

По своим физическим и химическим свойствам вирусы полиомиелита очень схожи с энтеровирусами, поскольку данный вирус (а точнее, вид *Enterovirus C*, в который входят 3 типа вирусов полиомиелита) является классическим представителем энтеровирусов. Они достаточно устойчивы к внешней среде, поэтому могут сохранять свои патогенные свойства в сточных водах и почве при температуре 0°C месяцами. Пагубно действует на полиомиелитный вирус нагревание, поскольку уже через 30 мин при 50°C они полностью инактивируются, но нельзя забывать о существовании их термостабильных мутантов [13], а добавление в вирус-содержащий материал двухвалентных катионов магния в одномолярной концентрации может сохранить титр вируса при 50°C в течение часа практически неизменным [14, 15].

Данные вирусы устойчивы к основным дезинфектантам, но чувствительны к высушиванию и ультрафиолетовым лучам, а также к хлорсодержащим дезинфектантам, представленными в основном хлором, хлорамином, двуокисью хлора ( $\text{ClO}_2$ ) [16 – 18] или озоном [19].

### **Лабораторная диагностика вирусов полиомиелита**

Роль лабораторных исследований при постановке диагноза полиомиелита чрезвычайно важна, поскольку направлена, во-первых, на установление этиологии заболевания, а во-вторых — на определение типа вируса полиомиелита. Кроме того, при отсутствии лабораторных исследований на вирус полиомиелита появляется возможность постановки ошибочного клинического диагноза, поскольку непаралитический полиомиелит может иметь сходную картину с серозным менингитом, вызванным различными энтеровирусами, возбудителями паротита, лимфоцитарного хориоменингита, вирусами простого герпеса или вирусом гер-

пес-зостер и др. [20]. Спинальная форма паралитического полиомиелита может быть пропущена врачом-клиницистом из-за схожести клинической картины с миелитом или полирадикулоневритом. В резидуальном и восстановительном периоде велик процент ошибок с рядом заболеваний, которые протекают с периферическими параличами и вторичными костными деформациями. В связи с этим даже в «ясных» для врача случаях необходимо проведение лабораторных исследований биологического материала от больного на присутствие вируса полиомиелита [21, 22].

### **Материал для исследования**

Для подтверждения вирусной этиологии заболевания необходимо проведение лабораторного исследования, эффективность которого зависит от правильного сбора соответствующих материалов (тканей, фекалий, носоглоточных смывов, крови, везикулярной жидкости, спинномозговой жидкости) и транспортирования их в лабораторию.

Все пробы для выделения вируса полиомиелита необходимо брать с соблюдением соответствующих предосторожностей для исключения контаминации одной пробы материалом другой пробы этого же больного или материалом пробы другого обследуемого. Для успешного лабораторного исследования необходимо производить как можно более ранний отбор проб от момента заболевания.

Забор материалов осуществляется медицинскими работниками лечебно-профилактического учреждения, куда госпитализирован больной. Для отбора проб используют стерильную стеклянную или пластиковую посуду [4].

Основным материалом для исследования являются фекальные массы, где вирус обнаруживается в течение 3 – 4 недель после заражения [23, 24].

Две пробы фекалий для выделения вируса отбирают в течение 7 дней после начала болезни, но не позднее 14 дней, с интервалом 24 – 48 ч.

Носоглоточные/ротоглоточные смывы отбирают в первые 3 – 4 дня от начала заболевания. Для получения носоглоточного/глоточного смыва можно использовать стерильную дистиллированную воду, бульон или солевой раствор. Отбор материала с помощью глоточного тампона производят в те же сроки. Тампоном протирают заднюю стенку глотки, миндалин и небных дужек. Тампоны помещают в пробирку с 1 – 2 мл раствора Хэнкса; пробу исследуют сразу или хранят в замороженном виде.

Спинномозговую жидкость берут в первые дни болезни в асептических условиях стерильным шприцем только по клиническим показаниям.

Пробы крови для серологической диагностики можно брать в любое время, поскольку наличие антител к вирусам полиомиелита в крови и воз-

возможность их обнаружения в пробе не связаны с состоянием организма в момент сбора пробы крови.

На всех этапах взятия и обработки крови принимают меры для предотвращения гемолиза. Первую пробу крови (1,5–3 мл) берут как можно раньше после начала болезни, вторую – на 3–4-й неделе, в стадии реконвалесценции. Параллельно кровь исследуют на выделение вируса – возбудителя болезни.

В случае летального исхода для исследования проводят забор секционного материала (ткани головного, спинного и продолговатого мозга и валиевого моста, содержимое кишечника и ткань кишечной стенки). При необходимости исследованию подвергают и другие материалы – ткань сердечной мышцы, печени, легких, селезенки, почек, лимфатических узлов, глаза и т.д. Пробу нужно брать как можно раньше после смерти. Ткани берут в заранее намеченном порядке, чтобы избежать их контаминации с содержимым желудка и кишечника. Для иссечения тканей пользуются стерильными инструментами (отдельный набор для каждой пробы). Объем каждой пробы (кусочка) из тканей центральной нервной системы должен составлять примерно 1 см<sup>3</sup>; из толстой кишки иссекается сегмент длиной 3–5 см, содержащий фекальные массы.

Собранные пробы немедленно отправляют в лабораторию. Все пробы, кроме фекалий, спинномозговой жидкости и крови, сразу же после взятия помещают в транспортировочную среду. Пробы хранятся и транспортируются при 4–8°C, если время доставки не превышает 72 ч, или в замороженном виде, если превышает. Их сохраняют в таком состоянии до получения лабораторией. Сыворотки без добавления консервантов хранят в замороженном виде. Повторное замораживание и оттаивание сывороток (больше 4 раз) может оказывать неблагоприятное влияние на титр антител.

### **Подготовка фекальных масс**

#### **для исследования на тканевых культурах**

До приготовления фекальной суспензии присланную в лабораторию «исходную» пробу делят пополам, одну часть используют для приготовления суспензии, другую хранят при –20°C (для отправки в НЦ, для повторного исследования пробы в случае необходимости).

Для исследования в культуре клеток фекальные пробы обрабатывают хлороформом для удаления бактерий, грибков, цитотоксических липидов, для разъединения вирусных агрегатов.

Для приготовления 20% фекальной суспензии устойчивые к хлороформу полиэтиленовые центрифужные пробирки ёмкостью 50 мл маркируют в соответствии с номером пробы. В каждую про-

бирку вносят 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) с антибиотиками, 1 г стеклянных бусин и 1 мл хлороформа. В пробирку вносят 2 г фекальной пробы. Плотнo закрывают центрифужную пробирку и тщательно встряхивают в течение 20 мин в механическом шейкере или вручную. Центрифугируют 20 мин при 1500 г в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость каждой пробы переносят в два маркированных флакона с винтовой крышкой. Если жидкость непрозрачна, обработку хлороформом повторяют. Суспензию из одного флакона используют для исследования, второй флакон хранят при –20°C для отправки в НЦ, если это будет необходимо.

Пробы, отобранные с помощью ректальных «соломинок», готовят для исследования так же, как и фекальные пробы.

Ёмкость, содержащую ректальный тампон в транспортировочной среде, тщательно встряхивают в механическом шейкере или вручную для того, чтобы фекальный материал перешёл в жидкость. Стерильным пинцетом плотно прижимают тампон к стенке ёмкости, отжимают жидкость, которую переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 мин при 1500 г в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость осторожно переносят в два маркированных флакона и хранят при –20°C.

Из тканей центральной нервной системы (ЦНС) (головной мозг, продолговатый мозг, спинной мозг), помещённых в транспортировочную среду, готовят 10% суспензию в ФСБ с антибиотиками. Гомогенизируют в измельчителе, переносят жидкость в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 мин при 1500 г в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость осторожно переносят в два маркированных флакона и хранят при –20°C.

Участок толстой кишки вместе с содержимым используют для приготовления 20% суспензии и обрабатывают так же, как пробы фекалий [4].

### **Выделение и размножение вируса полиомиелита на клеточных линиях**

В настоящее время выделение вируса полиомиелита на тканевых культурах является «золотым стандартом», поскольку для него показана 100% эффективность. В 1949–1955 г. благодаря исследованиям Эндерса, Мельника, Дульбекко и др. впервые появилась возможность выделить и идентифицировать вирусы, относящиеся к роду *Enterovirus* в культуре клеток [25–27].

Согласно рекомендациям ВОЗ, выделение и размножение вируса полиомиелита желательно проводить на двух линиях клеток RD и L20B. Клетки линии RD – это клетки человека, полученные из эмбриональной рабдомиосаркомы и являющи-

еся наиболее чувствительными для детекции полиовируса [23, 24]; линия L20B, обеспечивающая селективное выделение вируса полиомиелита, — это рекомбинантная линия мышинных клеток, у которых с помощью генной инженерии появилась способность экспрессировать человеческий рецептор вируса полиомиелита (PVR) [28]. Также для выделения и размножения вируса полиомиелита и серологического мониторинга напряженности иммунитета правомочно использовать культуры клеток Нер-2 и VGM, однако их применение для официальной диагностики не сертифицировано [29, 30].

Обработанную пробу фекальных масс вносят в пробирки с сформированным монослоем клеток в объеме 0,2 мл и инкубируют при 36°C с ежедневным микроскопированием для выявления цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). После появления ЦПЭ, оцененного на 4+, проводится второй пассаж, и при получении аналогичных результатов данный материал используется для идентификации вируса, поскольку дегенерация большого числа клеток в монослое явно указывает на высокую концентрацию вируса. При отсутствии ЦПЭ при первичном заражении клеток в течение 7 дней на 8-е сутки проводится второй «слепой» пассаж, и если и в последующие 7 дней ЦПЭ не фиксируется, то результат исследования образца расценивается как отрицательный.

#### **Идентификация выделенных полиомиелитных вирусов**

С помощью реакции нейтрализации проводят идентификацию выделенных штаммов вирусов полиомиелита с применением набора сывороток специфичных к вирусам полиомиелита I, II и III серотипа. Принцип реакции заключается во взаимодействии исследуемого вируса с гомологичной антисывороткой, которая и нейтрализует вирус, и результат виден в отсутствии ЦПЭ на культуре клеток. При проведении данной реакции диагностическая сыворотка и суспензия вируса смешиваются в равном объеме с последующей инкубацией при 36°C в течение 60 мин и после этого добавлением суспензии клеток. Приготовленная таким образом смесь помещается в термостат, в течение 5 суток проводят ежедневное микроскопирование до получения результата идентификации. Типирование выделенного вируса можно проводить, применяя метод цветной пробы. Суть метода заключается в изменении цвета фенолового красного, используемого в качестве индикатора.

#### **Серологическая диагностика полиомиелита**

В лабораторной практической работе большое внимание уделяется серологическим методам исследования при полиомиелитной инфекции. Для

титрования антител могут быть применены реакция нейтрализации, реакция связывания комплемента и реакция преципитации.

При проведении серологической диагностики необходимо выявление четырехкратного нарастания титра антител в пробе сыворотки, взятой в период реконвалесценции, по сравнению с титром антител в пробе, взятой в острой стадии болезни [31].

А. Титрование вируснейтрализующих антител может производиться по:

1. Цитопатогенному методу (титром антител считают то наивысшее разведение сыворотки, которое подавляет цитопатогенное действие рабочей дозы вируса во всех зараженных данной смесью пробирках).

2. Методу цветной пробы.

3. Методу бляшек, основанному на образовании вирусом негативных колоний (бляшек) в однослойных культурах, залитых агаровой средой, содержащей витальный краситель нейтральный красный.

Б. Реакция связывания комплемента выявляет взаимодействие антигена с антителом в среде, содержащей третий дополнительный компонент реакции, — комплемент, способный адсорбироваться на специфическом иммунном комплексе. Наличие или отсутствие комплемента в заключительной фазе реакции определяется с помощью индикаторной гемолитической системы.

В. Реакция преципитации в агаре представляет собой агрегацию вирусного антигена в присутствии специфических антител и проявляется в образовании полосы преципитата в слое агара между лунками, содержащими антиген и иммунную сыворотку.

#### **Использование метода полимеразной цепной реакции или её разновидностей для диагностики полиомиелита**

В последнее время все большее распространение получают новейшие методы диагностики, основанные на обнаружении в исследуемых клинических образцах специфических последовательностей вирусного генома. Наибольшее внимание среди этих методов привлекает полимеразная цепная реакция (ПЦР) [32].

Полимеразная цепная реакция впервые была осуществлена в 1985 г. в фирме «Cetus» [33], а последующее использование в ПЦР термостабильной ДНК-полимеразы существенно расширило возможности её применения как в научных целях, так и в клинической диагностике.

ПЦР — это осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация нуклеиновых кислот, иницируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами [34]. Техника увеличения количества

копий нуклеиновой кислоты была применена для обнаружения в материалах больных возбудителей энтеровирусов, к которым относятся и вирусы полиомиелита [35–37]. Главное достоинство метода — его высокая чувствительность: в результате амплификации концентрация специфической олигонуклеотидной последовательности в реакционной пробе возрастает в десятки миллионов раз. Применение ПЦР в диагностике можно считать достаточно обоснованным только для энтеровирусов, которые плохо размножаются в культурах клеток, чего нельзя сказать про вирусы полиомиелита. Пока ни одна ПЦР-система не показала такую же эффективность, т.е. выделяемость вирусов полиомиелита из проб биологического материала и объектов окружающей среды как культуральный метод. В случае с вирусами полиомиелита проблемой для ПЦР-диагностики является сложность пробы, её загрязнённость примесями, снижающими активность ферментов, а также низкая концентрация вирусов и наличие их смесей [38–40].

Конечно, ПЦР возможно применять не только для обнаружения вирусов полиомиелита у больных, находящихся в клинике, но и для ретроспективной диагностики. Авторы использовали их отличительную особенность, заключающуюся в высокой концентрации консервативных последовательностей в 5'-нейтранслируемой области генома. Полимеразная цепная реакция используется для исследования не только спинномозговой жидкости пациентов, но и других биологических проб (фекалии, моча, носоглоточные смывы больного) [41–44].

Применение ПЦР в клинике для диагностики инфекций явилось достаточно мощным оружием в руках не только врачей-вирусологов, поскольку постановка реакции занимает от 5 до 24 ч, но и лечащих врачей, поскольку происходит быстрая дифференцировка поступающих больных, изменяется и своевременно назначается правильная схема противовирусного лечения, ведущая к уменьшению стоимости лечения и сокращению пребывания пациента в больнице [45, 46].

На основе амплификации нуклеиновых последовательностей разработан ряд вариантов, включающих, помимо ПЦР, различные методы лигазной цепной реакции, а также реакцию 3SP (обозначаемую иногда NASBA), которая отличается от ПЦР использованием трех ферментов: обратной транскриптазы, РНК-азы H и РНК-полимеразы. Данная реакция протекает волнообразно по схеме «обратная транскрипция — транскрипция» [47]. Принцип лигазной цепной реакции (ЛЦР) аналогичен принципу ПЦР.

В последние годы в связи с новейшими биотехнологиями в изготовлении коммерческих систем для ПЦР их чувствительность стала достигать мате-

матически возможного предела (детекция 1 копии ДНК-матрицы), поэтому перед исследователями встает проблема получения ложноположительных результатов ПЦР. Это возможно вследствие переноса через предметы и реагенты как самой ДНК-матрицы, что происходит достаточно редко, так и амплификатов, происходящих чрезвычайно часто и получаемых в больших количествах во многих пробирках в процессе ежедневной работы [48]. В связи с указанным выше, в данное время применяют методы, альтернативные ПЦР, которые имеют реальные перспективы дальнейшего развития. К таким методам относится каталитическая амплификационная система или циклическая зондовая технология (ЦЗТ) — метод, противоположный ПЦР, поскольку принцип состоит не в сшивании двух олигонуклеотидных зондов, а наоборот, в расщеплении рибонуклеотидной комплементарной вставки с помощью РНКазы H и получения из одного длинного ДНК-РНК-ДНК-зонда двух коротких ДНК-олигонуклеотидов, которые затем детектируются одним универсальным дезоксирибонуклеотидным зондом, конъюгированным с маркерным ферментом [49].

Все описанные методы, направленные на выделение РНК вирусов полиомиелита, должны проводиться стандартно, с помощью коммерческих тест-систем и специального оснащения лаборатории аппаратами для проведения данного исследования.

#### **Экспрессные методы лабораторной диагностики полиомиелита**

Для быстрой лабораторной диагностики полиомиелитных вирусов в материалах больных достаточно широко применяется метод встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) [50]. По чувствительности ВИЭФ уступает радиоиммунологическим, иммуноферментным методам, не говоря о ПЦР, однако он более прост технически, экономичен и при его постановке используются коммерческие типоспецифические сыворотки и их смеси для реакции нейтрализации. Одним из условий применения ВИЭФ является приготовление концентрированных полиэтиленгликолем антигенов.

Другим не менее интересным методом для обнаружения полиовирусов является электронное микроскопирование культуры клеток, инфицированных вирусом. Данный метод исследования позволяет в цитоплазме инфицированных клеток уже через 2 ч после их заражения обнаруживать скопления рибосомоподобных электронно-плотных гранул, в толще и по периферии которых располагаются полые и электронно-плотные шары с диаметром, соответствующим диаметру энтеровирусов (Коксаки В) по своей морфологии [51].

В настоящее время должное внимание уделяется достаточно давно разработанному методу по применению бептонита для выявления полиомиелитных вирусов у человека и во внешней среде. Метод основан на способности штаммов адсорбироваться на бептоните, при различных значениях РН, а также способности вирусов прочно на нем фиксироваться и не поддаваться действию элюирующих жидкостей [52].

Для обнаружения полиомиелитных вирусных или энтеровирусных штаммов уже в первые часы заражения культуральной жидкости и контакта с клеткой, несомненно, может подойти метод, определяющий электрокинетический потенциал зараженных клеток. Установлено, что энтеровирусы группы полио изменяют в сторону уменьшения подвижность клеток линий Нер-2 и HeLa [53]. Данный экспресс-метод позволяет отделить клетки, пораженные вирусом полиомиелита, но не позволяет их дифференцировать, что и делает его неспецифичным, поскольку заражение клетки не только полиомиелитным вирусом, но и энтеровирусами приводит к изменению этого параметра.

Наиболее интересным из предлагаемых экспресс-методов, несомненно, является модифицированная реакция связывания комплемента (м-РСК), разработанная в Детском научно-клиническом центре инфекционных болезней (г. Санкт-Петербург). Суть метода заключается в том, что если биологический материал, требующий исследования, содержал полиовирусные частицы, то при проведении реакции, т.е. добавлении к испытуемому материалу стандартных диагностических сывороток и комплемента, образовывался комплекс антиген + антитела + белки системы комплемента, и после добавления гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, начинался лизис эритроцитов и выход в раствор оксидазных ферментов, концентрация которых была незначительна, а добавление ортофенилендиамина и перекиси водорода давало низкий цифровой показатель экстинции. Если биологическая проба не содержала полиомиелитные вирусы, то при аналогичном проведении исследования комплекса не образовывалось, и после добавления гемолитической системы происходил лизис эритроцитов барана, сопровождавшийся массивным выходом оксидазных ферментов, а следовательно, после добавления смеси ортофенилендиамина и перекиси водорода величина экстинции резко увеличивалась. Таким образом, в течение 6 ч без использования тканевых культур оказалось возможным обнаруживать вирусы полиомиелита или их антигены в фекалиях, сыворотке крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) больных с определением типа вируса полиомиелита [54].

### **Дифференциация диких и аттенуированных вариантов вируса полиомиелита**

Для установления вариантов вирусов полиомиелита и разграничения их на дикие и вакцинные необходимо проводить внутритиповую дифференциацию.

Нужно помнить, что дикие вирусы хорошо размножаются при повышении температуры культивирования в тканевых культурах до 40°C и снижают свою репродуктивную способность при 35–36°C, тогда как вакцинные аттенуированные вирусы обладают пониженной способностью размножения при 40°C и хорошей — при 35–36°C. Размножение в кислой среде не влияет на дикие вирусы полиомиелита, а у вакцинных штаммов оно понижено. Для окончательной идентификации диких и аттенуированных вариантов вируса полиомиелита полученный материал необходимо переправлять в вирусологические лаборатории, аккредитованные ВОЗ для проведения антигенного и молекулярного методов, основанных на различных принципах. Антигенный метод позволяет обнаруживать антигенные различия между диким и вакцинным штаммом, а молекулярный метод выявляет различия в РНК этих вирусов.

### **Заключение**

Анализ современных возможностей диагностики вирусов полиомиелита показал, что для подтверждения этиологии заболевания не всегда достаточно выделить вирус и выявить наличие специфических противовирусных антител. Особенно это касается этиологии спорадических случаев заболевания или первых случаев заболеваний во время вспышек, этиология которых на первых порах бывает неясной. Интерпретация лабораторных данных требует особенной осторожности.

Для верификации возбудителя заболевания сбор и анализ данных должны быть многосторонними. Клиническая картина болезни неясной этиологии характеризуется физическими, лабораторными, патолого-анатомическими данными. Должны быть изучены эпидемиологические характеристики заболевания (источник инфекции, пути передачи, возраст пациентов, социальные, географические условия, сезонность и т.п. в пользу его своеобразия). Дополнительно должна осуществляться дифференциальная диагностика, исключая роль других микроорганизмов и возможных неинфекционных причин.

Из биологических материалов больного обязательно должен быть выявлен вирусный агент или выделены его нуклеотидные последовательности, а также установлена таксономическая принадлежность, показаны сероконверсия или другие признаки иммунитета после перенесенного заболевания.

Инфицирование может быть воспроизведено на культуре ткани для изучения характеристик выделенного вируса; со стороны пациента учтено влияние на развитие заболевания других воздействий (например, интерференции с вакцинным вирусом полиомиелита у детей с энтеровирусной инфекцией).

Результаты исследований на полиомиелитные вирусы с подтверждением этиологии должны быть проверены в референс-лабораториях.

Необходимо принять во внимание тот факт, что вирусы полиомиелита часто можно выделить от здоровых людей, поэтому простое выделение вируса еще не является точным доказательством этиологической роли этого агента в развитии заболевания и может быть случайным совпадением.

Выделение вируса полиомиелита из пищеварительного тракта даже при 4-кратном нарастании титра антител к нему может не иметь отношения к основному заболеванию, по которому было обращение. Вместе с тем, регулярное выделение полиомиелитного вируса одного типа от сходных случаев заболеваний и от клинически здоровых лиц из окружения больных в совокупности с гомотипичной иммунологической реакцией является веским доказательством этиологической роли соответствующего вирусного агента.

Выделение предполагаемого полиомиелитного вируса из стерильных жидкостей организма (СМЖ, кровь и др.) или из тканей (центральной нервной системы, сердечной мышцы и др.), обнаружение характерных патолого-анатомических признаков, обнаружение вирусного антигена (или геномных последовательностей вируса) в пораженных клетках рассматривают как подтверждение этиологической причины заболевания.

#### Литература

- Скрипченко, Н.В. Энтеровирусная инфекция у детей (эпидемиология, этиология, диагностика, клиника, терапия, профилактика): учебное пособие для врачей и медицинских сестер / Н.В. Скрипченко. — СПб.: НИИДИ, 2009. — 96 с.
- Иванова, В.В. Инфекционные болезни у детей: руководство для врачей / В.В. Иванова. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. — 832с.
- Беляков, В. Д. Эпидемиология: учебник / В. Д. Беляков, Р. Х. Яфаев — М.: Медицина, 1989. — 416 с.
- Лобзин, Ю.В. Энтеровирусные инфекции: руководство для врачей / Ю.В. Лобзин, Н.В. Скрипченко, Е.А. Мурина. — СПб, 2012. — 432 с.
- Лещинская, Е.В. Случаи вакциноассоциированного паралитического полиомиелита в Российской Федерации в 2000—2002 гг. / Е.В. Лещинская [и др.] // Российский медицинский журнал. — 2004. — № 3. — С. 19—24.
- Глобальная ликвидация полиомиелита // Отчет о третьем совещании Глобальной технической консультативной группы (ТКГ) 7—8 июля 1998 г. — Женева.: 1998. Приказ МЗ №24 от 25.01.99 г. «Об усилении работы по реализации программы ликвидации полиомиелита в Российской Федерации к 2000 г.»
- Программа ликвидации полиомиелита в Санкт-Петербурге на 1997—2000 годы. — 1997. — СПб. — 7 с.
- Drake J.W., Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl AcadSci USA*. 1999; 96: 13910-13
- Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol*. 1988; 6: 558-62
- Kew O.M., Mulders M.N., Lipskaya G.Yu, da Silva E.E., Pallansch M.A. Molecular epidemiology of polioviruses. *Sem-Virol*. 1995; 66: 401-14.
- Kinnunen L, Poyry T, Hovi T. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts. *Curr Top Microbiol-Immunol*. 1992; 176: 49-61.
- Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., et al. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol*. 2000; 74(16): 7381-90.
- Shiomi H., Urasawa T., Urasawa S., et al. Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50 degrees Celsius for 30 min. *J. Med. Virol*. 2004; 74(3): 484—91.
- Ackermann W.W., Fujioka R.S., Kurtz H.B. Cationic modulation of the inactivation of poliovirus by heat. *Arch. Environ. Health*. 1970; 21(3): 377—81
- Dorval B.L., Chow M., Klivanov A.M. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1989; 159(3): 1177—83.
- Shin G.-A., Sobsey M.D. Reduction of Norwalk virus, Poliovirus 1 and coliphage MS2 by monochloramine disinfection of water. *Water Sci. Technol*. 1998; 38(12):151—54.
- Alvarez M.E., O'Brien R.T. Effects of chlorine concentration on the structure of Poliovirus. *Appl. Environ. Microbiol*. 1982; 43(1): 237—39.
- Alvarez M.E., O'Brien R.T. Mechanism of inactivation of Poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Appl. Environ. Microbiol*. 1982; 44(5): 1064—71.
- Herbold K., Flehmig B., Botzenhart K. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of Hepatitis A virus, Poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol*. 1989; 55(11): 2949—53
- Носов, С. Д. Руководство по инфекционным болезням у детей / С.Д. Носов. — 2-е издание, переработанное и дополненное — М.: Медицина, 1980. — 600 с.
- Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита. ВОЗ. Женева, 1998.
- Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. ВОЗ. Женева. 2005.
- Лашкевич, В.А. Непوليوмиелитные энтеровирусные инфекции: эпидемиология, характеристика энтеровирусов, клиника, диагностика, профилактика: методическое пособие / В.А. Лашкевич, С.Г. Дроздов, В.П. Грачев. — М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора РФ, 2004.
- Энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика: Методические указания (МУ 3.1.1.2130-06).
- Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 1954, 99: 167-182.
- Enders J.F. Early observations on cytopathogenicity of poliovirus. *American Journal of Clinical Pathology* 1972; 57(6): 846
- Melnick, J.I., Ledinko N. Vaccination as a provoking factor in poliomyelitis: An experimental approach. *Journal of Infectious Diseases*. 1952; 90:279.
- Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП). Методические указания. МУК 4.2.2410-08 (утв. Роспотребнадзором 28.07.2008).



29. Manor Y, Handsher R, Halmut T, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1670 – 75.
30. Dahling D.R., Wright B.A. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51 (4): 790-812.
31. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и острыми вялыми параличами в постсертификационный период. Методические указания МУ 3.1.1.2360-08.
32. Arola A., Kallajoki M., Ruuskanen O., Huypia T. Detection of enteroviral RNA in end-stage dilated cardiomyopathy in children and adolescents. *J. Med. Virol.* 1998; 56(4): 364-71.
33. Mullis K.B., Faloona F.A. R. Wu (ed.). *Methods in enzymology*. London. Academic Press. 1987; 155: 335 – 50.
34. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., et al. PCR protocols, a guide to methods and applications. California: Academic Press & San Diego. 1990; 241p.
35. Glimaker M., Johansson B., Ols n P., et al. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1992; 25: 547 – 57.
36. Petitjean J., Freymuth F., Kopecka H., et al. Detection of enteroviruses in cerebrospinal fluids: enzymatic amplification and hybridization with biotinylated riboprobe. *Mol. Cell. Probes.* 1994; 8:15 – 22
37. Rotbart H.A. Diagnosis of enteroviral meningitis with polymerase chain reaction. *J. Pediatr.* 1990; 117:85 – 89.
38. Ahmed A., Hickey SM, Ehrett S, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of enteroviral meningitis in infancy. *Pediatrics.* 1997; 131:393 – 97.
39. Andraoletti L., Blassel-Damman N., Dewilde A. Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum, and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 589 – 91.
40. Hamilton M.S., Jackson M.A., Abel D. Clinical utility of polymerase chain reaction testing for enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 533 – 37.
41. Akhtar N., Ni J., Stromberg D., Rosenthal G.L., et al. Tracheal aspirate as a substrate for polymerase chain reaction detection of viral genome in childhood pneumonia and myocarditis. *Circulation.* 1999; 99:2011 – 18.
42. Egger D., Pasamontes L., Ostermayer M., Bienz K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:1442 -47.
43. Muir P., Nicholson F., Jhetam M., et al. Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:31 – 38.
44. Pichichero M.E., McLinn S., Rotbart H.A., et al. Clinical and economic impact of enterovirus illness in private pediatric practice. *Pediatrics.* 1988; 102: 1126 – 34.
45. Carrie L., Byington C.L., Taggart E.W., et al. A polymerase chain reaction-based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolioenteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger. *Pediatrics.* 1999; 103: 27.
46. Marshall G.S., Hauck M.A., Buck G., Rabalais G.P. Potential cost savings through rapid diagnosis of enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997; 16: 1086 – 87.
47. Casas J., Pozo F., Trallero G., et al. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: A search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J. Med. Virol.* 1999; 57(2):145-51.
48. Федоров, Н.А. Методы генодиагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний / Н.А. Федоров // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 1996. – Т 6, № 1. – С. 20 – 23.
49. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *BioTechniques* 1990; 9:142-148.
50. Залесских, А.Ф. Ускоренный метод идентификации энтеровирусов методом встречного иммуноэлектрофореза / А.Ф. Залесских // Вопросы вирусологии. -1982.- № 2. – С. 197-199.
51. Ланская, Т.И. Электронномикроскопическое исследование культуры клеток Нер-2, инфицированных вирусом Коксаки группы В / Т.И. Ланская, Б.А. Ерман, В.С. Головин // Материалы XV научной сессии института полиомиелита и вирусных энцефалитов.- М.; 1968. – С. 65-68.
52. Дяченко, С.С. Изучение возможных механизмов дифференциации вирусов Коксаки по свойству адсорбции на бентоните // С.С. Дяченко, В.П. Ширококов // Материалы XV научной сессии института полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М.; 1968. – С. 32-39.
53. Кузовлев, А.П. Действие энтеральных вирусов на электрокинетический потенциал клеток / А.П. Кузовлев // Материалы научной конференции «Энтеровирусные инфекции». – Свердловск; 1967. – С. 18-19.
54. Мурина, Е.А. Характеристика вирулентных серотипов энтеровирусов и их роль в генезе серьезных менингитов и острых вялых параличей : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. / Е.А. Мурина. – СПб.: НИИДИ, 2002. – 43 с.

#### References

1. Skripchenko N.V. Enterovirus infection in children (epidemiology, etiology, diagnosis, clinic, therapy, prevention): Guidelines for doctors and nurses. S-Petersburg; 2009 (in Russian).
2. Ivanova, V.V. Infectious diseases in children: Guidelines for doctors. Moscow; 2009 (in Russian).
3. Beljakov V. D., Jafaev R.H. Epidemiology. Moscow; 1989 (in Russian).
4. Lobzin Ju.V., Skripchenko N.V., Murina E.A. Enterovirus infections: Guidelines for doctors. S-Petersburg; 2012 (in Russian).
5. E.V. Leshhinskaja, O.E. Ivanova, T.P. Ereemeeva, [i soavt.]. Rossijskij medicinskij zhurnal. 2004; 3: 19-24 (in Russian).
6. Global eradication of poliomyelitis // Report on the third meeting of the Global Technical Advisory Group (TAG) 7-8 July 1998 – Geneva. : 1998. Order of the Ministry of Health No. 24 of 25.01.99 "On strengthening the implementation of the polio eradication program in the Russian Federation by 2000 "
7. The polio eradication program in St. Petersburg for 1997-2000. S-Petersburg; 1997 (in Russian).
8. Drake J.W., Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl AcadSci USA.* 1999; 96: 13910- 13
9. Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol.* 1988; 6: 558-62
10. Kew O.M., Mulders M.N., Lipskaya G.Yu, da Silva E.E., Pallansch M.A. Molecular epidemiology of polioviruses. *SemVirol.* 1995; 66: 401-14.
11. Kinnunen L, Poyry T, Hovi T. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts. *Curr Top MicrobiolImmunol.* 1992; 176: 49-61.
12. Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., et al. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol.* 2000; 74(16): 7381-90.

13. Shiomi H., Urasawa T., Urasawa S., et al. Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50 degrees Celsius for 30 min. *J. Med. Virol.* 2004; 74(3): 484 – 91.
14. Ackermann W.W., Fujioka R.S., Kurtz H.B. Cationic modulation of the inactivation of poliovirus by heat. *Arch. Environ. Health.* 1970; 21(3): 377 – 81
15. Dorval B.L., Chow M., Klibanov A.M. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 159(3): 1177 – 83.
16. Shin G.-A., Sobsey M.D. Reduction of Norwalk virus, Poliovirus 1 and coliphage MS2 by monochloramine disinfection of water. *Water Sci. Technol.* 1998; 38(12):151 – 54.
17. Alvarez M.E., O'Brien R.T. Effects of chlorine concentration on the structure of Poliovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982; 43(1): 237 – 39.
18. Alvarez M.E., O'Brien R.T. Mechanism of inactivation of Poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982; 44(5): 1064 – 71.
19. Herbold K., Flehmig B., Botzenhart K. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of Hepatitis A virus, Poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55(11): 2949 – 53
20. Nosov S. D. Guide to infectious diseases in children. 2nd edition, revised and enlarged. Moscow; 1980 (in Russian)
21. Guidelines for virological research of poliomyelitis. WHO. Geneva, 1998.
22. Guidelines for laboratory research on poliomyelitis. WHO. Geneva, 2005.
23. Lashkevich V.A., Drozdov S.G., Grachev. V.P. Non-poliomyelitis enterovirus infections: epidemiology, the characteristics of enteroviruses, a clinic, diagnostics, prevention: a methodical manual. Moscow.: Federal Center for State Sanitary Epidemiological Supervision of the Russian Federation; 2004 (in Russian).
24. Enterovirus diseases: clinic, laboratory diagnostics, epidemiology, prevention: Guidelines (MU 3.1.1.2130-06).
25. Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 1954, 99: 167-182.
26. Enders J.F. Early observations on cytopathogenicity of poliovirus. *American Journal of Clinical Pathology* 1972; 57(6): 846
27. Melnick, J.I., Ledinko N. Vaccination as a provoking factor in poliomyelitis: An experimental approach. *Journal of Infectious Diseases.* 1952; 90:279.
28. Organization and conduct of virological studies of materials from patients with poliomyelitis, suspected of this disease, with acute flaccid paralysis syndrome (AFP). Methodical instructions. MUK 4.2.2410-08 (approved by Rospotrebnadzor on 28.07.2008).
29. Manor Y, Handsher R, Halmut T, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1670 – 75.
30. Dahling D.R., Wright B.A. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51 (4): 790-812.
31. Prevention of infectious diseases. Intestinal infections. Epidemiological surveillance of poliomyelitis and acute flaccid paralysis during the post-certification period. Methodical instructions MU 3.1.1.2360-08.
32. Arola A., Kallajoki M., Ruuskanen O., Hyypia T. Detection of enteroviral RNA in end-stage dilated cardiomyopathy in children and adolescents. *J.Med.Virol.* 1998; 56(4): 364-71.
33. Mullis K.B., Faloona F.A. R.Wu(ed.). *Methods in enzymology.* London. Academic Press. 1987; 155: 335 – 50.
34. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., et al. *PCR protocols, a guide to methods and applications.* California: Academic Press & San Diego. 1990; 241p.
35. Glimaker M., Johansson B., Ols n P., et al. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1992; 25: 547 – 57.
36. Petitjean J., Freymuth F., Kopecka H., et al. Detection of enteroviruses in cerebrospinal fluids: enzymatic amplification and hybridization with biotinylated riboprobe. *Mol. Cell. Probes.* 1994; 8:15 – 22
37. Rotbart H.A. Diagnosis of enteroviral meningitis with polymerase chain reaction. *J. Pediatr.* 1990; 117:85 – 89.
38. AhmedA, Hickey SM, Ehrett S, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of enteroviral meningitis in infancy. *Pediatrics.* 1997; 131:393 – 97.
39. Andraoletti L., Blassel-Damman N., Dewilde A. Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum, and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 589 – 91.
40. Hamilton M.S., Jackson M.A., Abel D. Clinical utility of polymerase chain reaction testing for enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 533 – 37.
41. Akhtar N., Ni J., Stromberg D., Rosenthal G.L., et al. Tracheal aspirate as a substrate for polymerase chain reaction detection of viral genome in childhood pneumonia and myocarditis. *Circulation.* 1999; 99:2011 – 18.
42. Egger D., Pasamontes L., Ostermayer M., Bienz K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:1442 -47.
43. Muir P., Nicholson F., Jhetam M., et al. Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:31 – 38.
44. Pichichero M.E., McLinn S., Rotbart H.A., et al. Clinical and economic impact of enterovirus illness in private pediatric practice. *Pediatrics.* 1988; 102: 1126 – 34.
45. Carrie L., Byington C.L., Taggart E.W., et al. A polymerase chain reaction-based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolioenteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger. *Pediatrics.* 1999;103: 27.
46. Marshall G.S., Hauck M.A., Buck G., Rabalais G.P. Potential cost savings through rapid diagnosis of enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997; 16: 1086 – 87.
47. Casas J., Pozo F., Trallero G., et al. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: A search for enterovirus and herpesviruses in a prospective study. *J.Med.Virol.* 1999; 57(2):145-51.
48. Fedorov N.A. *Rossiiskij zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii.* 1996; 6 (1): 20 – 3.
49. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B. Probeamplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *BioTechniques* 1990; 9:142-148.
50. Zaleskih A.F. *Voprosy virusologii.* 1982; 2: 197-9.
51. Lanskaja T.I., Erman B.A., Golovin V.S. Electron microscopy study of the culture of Hep-2 cells infected with the Cocksackie virus group B [Jelektronnomikroskopicheskoe issledovanie kul'tury kletok Hep-2, inficirovannyh virusom Koksaki gruppy V] In: *Materialy XV nauchoj sessii instituta poliomielitov i virusnyh jencefalitov [Materials of the XVth Scientific Session of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis].* Moscow; 1968. P. 65-68 (in Russian).
52. Djachenko S.S., Shirobokov V.P. A study of possible mechanisms of differentiation of Cocksackie viruses by the property of adsorption on bentonite [Izuchenie vozmozhnyh me-

hanizmov diferenciacii virusov Koksaki po svojstvu adsorbicii na bentonite] In: Materialy XV nauchnoj sessii instituta poliomyelita i virusnyh jencefalitov [Materials of the XV scientific session of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis]. Moscow; 1968. P. 32-39 (in Russian).

53. Kuzovlev A.P. Effects of enteral viruses on the electrokinetic potential of cells. Kuzovlev [Dejstvie jeneral'nyh virusov na jelektrokineticheskij potencial kletok ] In: Materials of the scientific conference "Enterovirus infections." [Materialy nauchnoj konferencii «Jenterovirusnye infekcii»]. Sverdlovsk; 1967. P. 18-19 (in Russian).

54. Murina E.A. Harakteristika virulentnyh serotipov jenterovirusov i ih rol' v geneze seroznyh meningitov i ostryh vjalyh paralichej [Characteristics of virulent serotypes of enteroviruses and their role in the genesis of serous meningitis and acute flaccid paralysis]: [avtoref. dissertation]. St. Petersburg (Russia): Science Research Institute of Children's Infections; 2002. 43 p. (in Russian). Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J Exp Med 1954, 99: 167-182.

---

*Авторский коллектив:*

*Мурина Елена Александровна* — ведущий научный сотрудник, руководитель отдела вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, д.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: lemur@niidi.ru

*Голева Ольга Владимировна* — старший научный сотрудник отдела вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, к.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: golev.ao@mail.ru

*Осипова Зинаида Алексеевна* — научный сотрудник отдела вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, к.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: zosipova11@mail.ru

*Мукомолова Анна Львовна* — научный сотрудник отдела вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, к.м.н., тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: amukomolova@mail.ru