

УДК 616.988.23-036.2-07-08-071.

© Коллектив авторов, 2009.

## РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**А. С. Прилуцкий, С. В. Бабенко, А. Г. Колесникова, С. О. Чернуцкий**

*Кафедра клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии (зав. – проф. А. С. Прилуцкий) Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, г. Донецк.*

### WORKING OUT AND APPLICATION OF MODERN LABORATORY METHODS AT EPIDEMIOLOGICAL MONITORING, DIAGNOSTICS AND TREATMENT ENTEROVIRUSES OF THE INFECTION

A. S. Prilutsky, S. V. Babenko, A. G. Kolesnikova, S. O. Chernutsky

#### SUMMARY

In work the estimation of specificity and sensitivity of test system PTSR, with specific primers to DNA 207 n.n is spent comparative. 5'-not broadcast areas генома an enterovirus for all types of enteroviruses (except a poliomyelitis virus) in comparison with classical the virology a method. And also the methodological approach of sharing of above described reaction PCR with definition of antibodies of a class IgG to viruses Cocksaki and ECHO in system IFA of diagnostics developed by authors, and a spectrum of application of the developed complex.

### РОЗРОБКА Й ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ ЛАБОРАТОРНИХ МЕТОДІВ ПРИ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНОМ МОНИТОРИНГІ, ДІАГНОСТИЦІ І ЛІКУВАННІ ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

О. С. Прилуцкий, С. В. Бабенко, Г. Г. Колесникова, С. О. Чернуцкий

#### РЕЗЮМЕ

У роботі проведена порівняльна оцінка специфічності й чутливості тест-системи ПЛР, зі специфічним праймером до ДНК 207 п.н. 5'-нетрансльованої області генома ентеровіруса для всіх типів ентеровірусів (крім вірусу поліомієліту) у порівнянні із класичним культуральним методом. А також методологічний підхід спільного використання вищеписаної реакції ПЦР із визначенням антитіл класу Ig до вірусів Коксаки й ЕЧНО у системі ІФА діагностики, розробленої авторами, і спектр застосування розробленого комплексу.

**Ключевые слова:** лабораторная диагностика, энтеровирусная инфекция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ.

Несмотря на длительную историю изучения энтеровирусных инфекций (ЭВИ), многие ключевые вопросы эпидемиологии и биологии ЭВИ остаются невыясненными. Практически не установлены масштабы циркуляции ЭВИ в популяции, структура и частота бессимптомных форм инфекции [1, 7]. Также неясно, какие причины приводят к формированию эпидемических штаммов и возникновению вспышек ЭВИ - молекулярные основы изменения вирулентности штаммов ЭВИ [4, 5]. Санитарно-противоэпидемические (профилактические) меры при локализации и купировании очагов носят, преимущественно, режимно-ограничительный характер. При этом одной из основных мер, направленных на разрыв путей передачи инфекции, является временное приостановление деятельности учреждений или предприятий, которое влечет за собой, ущерб социально-экономического характера [1-3]. Нельзя не принимать во внимание рост числа респираторных и острых кишечных заболеваний, этиологически связанных с энтеровирусами, равно как и точку зрения некоторых исследователей о возможном увеличении эпидемического потенциала ЭВИ в будущем, связанно-

го с изменением тактики иммунизации против полиомиелита в развитых странах мира [1, 7, 8]

Таким образом, для ответа на эти вопросы необходима подробная эпидемиологическая и вирусологическая информация о циркулирующих в стране ЭВИ и вызываемых ими заболеваниях [1, 3, 12]. Получение такой информации возможно только при полноценном функционировании системы эпидемиологического надзора за неполиомиелитными энтеровирусными инфекциями, что невозможно без использования современных методов диагностики [5, 9].

В настоящее время согласно рекомендациям ВОЗ для выделения энтеровирусов используют 2 линии перевиваемых клеточных культур – RD (Клеток рабдосаркомы человека) и HEp-2 (клеток эпидермальной карциномы человека). Обе линии клеточных культур являются высокочувствительными к полиовирусу. Обычно полиовирус, а так же вирус Коксаки В хорошо размножается в клетках HEp-2; полиовирусы и большинство вирусов ЕЧНО, а так же некоторые штаммы вирусов Коксаки А в RD. ВОЗ рекомендует использовать в вирусологических лабораториях для идентификации энтеровирусов кроме

классического вирусологического метода, метод полимеразой цепной реакции [4, 9, 10, 11]. В случае позитивной реакции в последнем методе, для окончательной идентификации полученных вирусов необходимо проведение исследования на клеточных культурах. Вместе с тем, методология использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики энтеровирусной инфекции, а также определение энтеровирусов в окружающей среде пока не приобрела широкого распространения [5, 8, 9, 11].

Цель нашей работы - разработать, провести сравнительную оценку специфичности и чувствительности тест-системы ПЦР, со специфическим праймером к ДНК 207 п.н. 5' -нетранслируемой области генома энтеровируса для всех типов энтеровирусов (кроме вируса полиомиелита) в сравнении с классическим культуральным методом [6, 7]. А также методологический подход совместного использования вышеописанной реакции ПЦР с определением антител класса IgG к вирусам Коксаки и ЕСНО в системе ИФА диагностики, разработанной авторами, и спектр применения разработанного комплекса [13].

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были обследованы 1274 больных (взрос-

лых и детей) находящихся в инфекционном отделении больницы №1 г. Донецка с подозрением на ЭВИ, а также очаги по месту их жительства. Были взяты 73 пробы питьевой воды, 152 пробы воды открытых водоемов и 146 проб сточных вод. Все исследования проводились при помощи классического культурального метода, разработанной тест-системы ПЦР и определения антител класса IgG Коксаки и ЕСНО в системе ИФА. Статистическая обработка полученных в результате исследований осуществлялось при помощи компьютерного вариационного, корреляционного, регрессивного анализа. Анализируются средние значения, их ошибки, среднеквадратичные отклонения, коэффициенты корреляции.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опираясь на рекомендации ВООЗ и проводя исследования крови, ликвора, фекалий, а также смывов из объектов внешней среды и проб воды (питьевой, сточных вод и открытых водоемов), вначале мы поставили перед собой задачу провести сравнительную характеристику полученной нами диагностической тест-системы ПЦР и классического вирусологического метода на культурах клеток, а затем определить ее возможную область применения [1-4].

Таблица 1

**Сравнительная характеристика эффективности разработанных препаратов для выявления возбудителей ЭВ в сравнении с классическим клеточным методом (ПЦР)**

№, п.п	Объект исследований	Культуральный метод		ПЦР	
		Количество проб	Процент выявления, %	Количество проб	Процент совпадения, %
1	Больные с разными диагнозами	163	100	159	97,5 ±1,22
2	Вода питьевая	73	100	65	89,0 ±2,45
3	Вода открытых водоёмов	152	100	113	74,3 ±3,42
4	Сточные воды	146	100	116	79,5 ±3,16
5	Пробы из очагов ЭВИ	152	100	141	85,4 ±1,37

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что наибольший процент совпадений положительных реакций мы наблюдаем в реакции ПЦР при обследовании людей, что составило 97,5±1,22%, несколько ниже процент совпадений при обследовании объектов внешней среды - от 74,3±3,42% до 85,4±1,37%. Все полученные результаты явились достоверными, что характеризует апробируемую тест-систему как достаточно точную. Следовательно, она может быть предложена как отечественный аналог.

Спектр применения разработанной тест - системы ПЦР:

1. В соответствии со статьей 40 Закона Украины «Об обеспечении санитарного и эпидемического благополучия населения» (4004-12), с целью научно-методического обеспечения государственного сани-

тарно-эпидемиологического надзора, а также руководствуясь методическими указаниями о «Вирусологическом мониторинге в системе эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями и путях его усовершенствования» [1,2], где предлагается проводить вирусологический мониторинг энтеровирусных инфекций, включающий в себя обследование инфекционных больных с клиническими проявлениями, при которых не исключена роль энтеровирусов, как этиологического фактора, нами с 1997 года - года взрывного резкого подъема ЭВИ в Донецкой области и по Украине - проводится обследование методом ПЦР и параллельно классическим вирусологическим методом больных (взрослых и детей) с различными заболеваниями вирусной этиологии при подозрении на ЭВИ [5,6]. Полученные ре-

зультаты позволяли лечащим врачам в более короткие сроки подтвердить или отвергнуть диагноз ЭВИ и, как результат, назначить правильное этиотропное лечение, а санитарным врачам в домашних очагах проводить комплекс противоэпидемических мероприятий [6,13]. При анализе сравнительных результа-

тов полученных после проведения классического вирусологического исследования и ПЦР мы должны отметить, что процент совпадений составил  $108,9 \pm 2,52$  до  $79,2 \pm 2,26$  в зависимости от исходного диагноза (таблица 2).

Таблица 2

**Выявление ЭВИ в крови, ликворе больных (ОРВИ, ОКИ, С. менингитом) при помощи ПЦР и культурального метода**

Диагноз	Количество проб	Методы обследования		Процент совпадения, %
		Культуральный	ПЦР	
ОРВИ	799	62	56	$90,3 \pm 1,05$
ОКИ	152	45	49	$108,9 \pm 2,52$
С. Менингит	323	56	54	$79,2 \pm 2,26$
Всего проб	1274	163	159	$97,5 \pm 0,43$

Проведенные исследования показали, что для диагностики энтеровирусной инфекции у больных с подозрением на энтеровирусную природу заболевания определение энтеровирусов с применением ПЦР в плазме крови и ликворе необходимо проводить по возможности в первый-второй день заболевания. Это обусловлено тем, что эффективность детекции РНК возбудителя в плазме крови прогрессивно снижается в зависимости от дня заболевания. Биологическим материалом для ПЦР могут быть: кровь, моча, слюна, ликвор, мазок из ротоглотки, мокрота, плевральный выпот, биопсийный материал, синовиальная жидкость, материал от женщин – соскоб (мазок), материал от мужчин – соскоб (мазок), сок простаты [4, 5].

2. Вирусологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями предлагает проводить наблюдения по эпидемиологическим показателям за контактными и больными в очаге ЭВИ. Нами с 1997 по 2007 год проводилось обследование при помощи ПЦР на наличие ЭВИ в домашних очагах.

Проведение лабораторных исследований в домашних очагах позволило нам выявить инфицированных общавшихся, которые впоследствии были классифицированы или как заразные, или как больные легкой стертой атипичной формы [2-4]. Получение положительных результатов при обследовании предметов обихода и остатков пищи позволило нам предположить ориентировочные факторы и механизм передачи. А регистрируемый высокий процент совпадений от  $107 \pm 1,88\%$  до  $82,6 \pm 3,50\%$  позволяет нам рекомендовать метод ПЦР для проведения эпидемиологического обследования в домашних очагах.

3. В системе эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями необходимо проводить исследования проб воды разного вида пользования с ведущей ролью среди них сточной воды. При исследовании сточной воды преимущество должно

предоставляться канализационным коллекторам, которые обслуживают большие группы населения. Математически рассчитанная оптимальная группа составляет 100-300 тыс. населения, которые обслуживаются одной канализационной системой и разрешает с высокой вероятностью выделить энтеровирусы при наличии одиночных случаев энтеровирусных инфекций. Нами за период с 1997 по 2007 года проводилось обследование методом ПЦР и классическим культуральным методом питьевой воды, воды открытых водоемов и сточных вод. Анализируя полученные результаты необходимо отметить, что метод ПЦР может быть использован для мониторинга ЭВИ во внешней среде, так как сравнивая полученные результаты за 10 лет с кривыми заболеваемости эпидемиологического анализа, мы получили одинаковую периодичность. Более того, полученные результаты обсемененности объектов внешней среды могут быть использованы для прогнозирования подъема заболеваемости. В наших исследованиях, как в годы подъемов, так и в годы спадов наибольшая концентрация ЭВ в питьевой воде регистрировалась за месяц до подъема заболеваемости среди людей (рис. 1).

Установлена прямая корреляционная связь между подъемом заболеваемости ЭВИ и обсемененностью вод открытых водоемов и сточных вод, что может быть использовано для наблюдения за заболеваемостью в данном населенном пункте (рис. 2).

На основании вышеизложенного, можно заключить: метод ПЦР может быть использован как для диагностики, так и для мониторинга ЭВИ, тем более что он имеет ряд преимуществ, таких как высокая специфичность, обусловленная нуклеотидной последовательностью праймеров; высокая чувствительность метода (10-1000 клеток в пробе); значительная скорость получения результата исследования (до 4-6 часов, т.е. на протяжении рабочего дня); возможность диагностики не только острых (манифестных) форм заболевания, но и латентных; для ПЦР исследования пригоден любой материал (тампоны с ма-

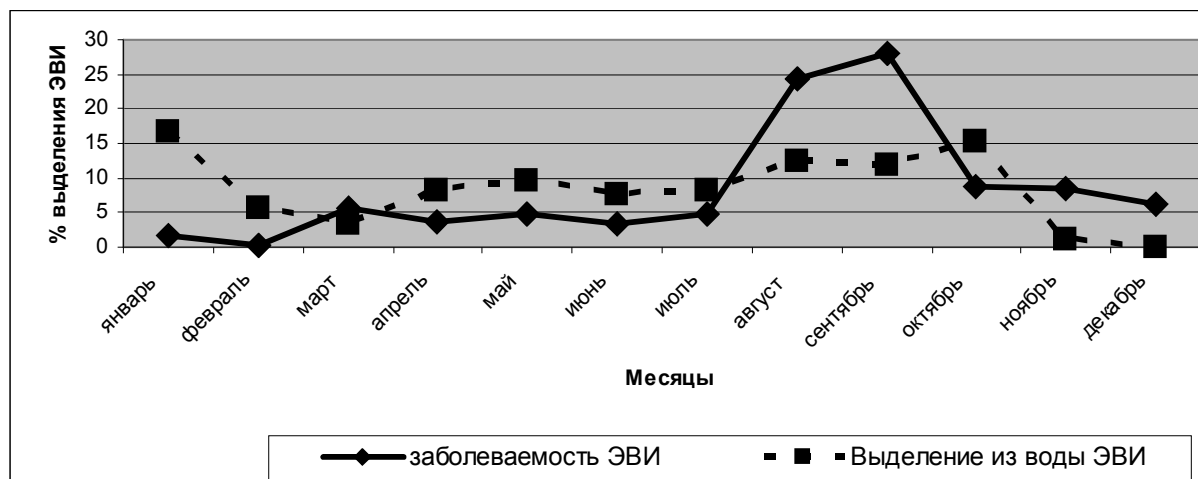


Рис. 1. Частота выделения ЭВ из питьевой воды в сравнении с заболеваемостью ЭВИ.

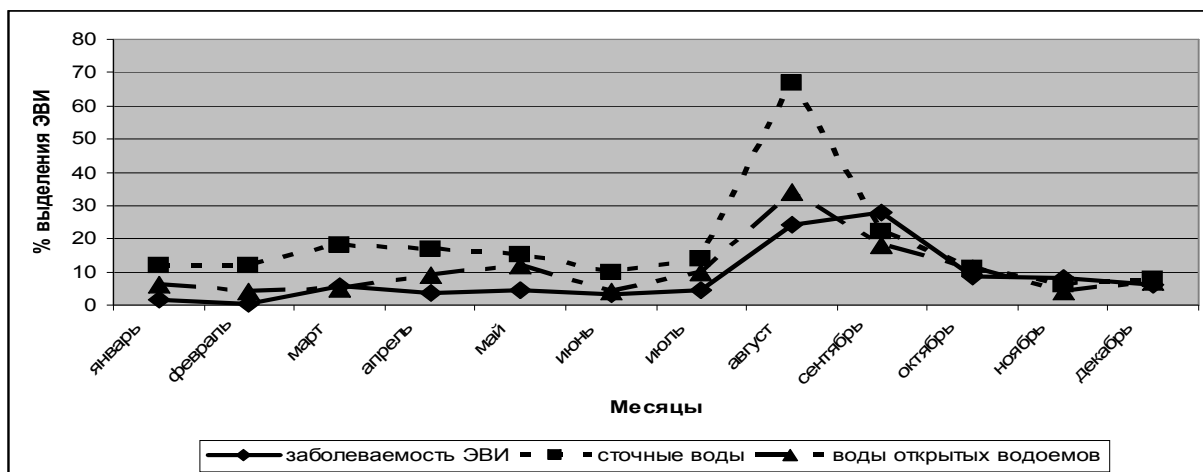


Рис.2. Частота выделения ЭВ из вод открытых водоемов и сточных вод в сравнении с заболеваемостью ЭВИ.

ками, кровь, моча и т.п.), выделение чистой культуры не обязательно; обследуемый материал может быть продезинфицирован химическими или термическими методами в момент отбора, что позволяет исключить возможность инфицирования персонала в ходе проведения ПЦР; простота выполнения и возможность автоматизации; ПЦР на сегодняшний день может считаться одним из самых распространенных методов клинической микробиологии, так как является наиболее качественным, простейшим, экономичным, довольно чувствительным, специфическим и воспроизводимым методом [7,8].

Характеризуя работу тест-системы ИФА для определения IgG при проверке на наличие перекрестного реагирования с антигенами вирусов полиомиелита 1 и 2 типов определено отсутствие разности уровня антител в группах привитых и не привитых, детей с низкими и высокими титрами антител к вирусам полиомиелита, лиц с низкими и высокими уровнями антител к полиомиелиту, который свидетельствует о ее специфичности [9,10].

При сравнении эффективности разработанной тест – системы с классическим вирусологическим методом, следует отметить, что процент совпадения составляет  $79,8 \pm 3,14\%$ . Согласно иммунологическим канонам наибольшая концентрация IgG, в среднем, приходится на третью неделю заболевания, что регистрировалось в наших контрольных исследованиях (таблица 3).

Полученные результаты говорят о чувствительности реактива и возможности его использования для установления стадии заболевания, возможностей персистенции вирусов или формирования носительства. Для эпидемиологов данная тест-система представляет интерес при установлении источников инфекции в расшифровке крупных вспышек или эпидемий, а также наличие легких стертых форм (таблица 4).

Установлено, что наличие антител класса IgG к антигенам вирусов Коксаки и ЕСНО регистрируется с разной частотой у лиц в зависимости от возраста. Учитывая, что диагностический уровень оптической плотности, который определяет наличие антител клас-

Таблица 3

Сравнительная характеристика эффективности разработанных препаратов для выявления IgG к ЭВ в сравнении с классическим клеточным методом (ИФА)

№, п.п	Объект исследований	Культуральный метод		ИФА			Итого, %	
		Количество проб	Процент выявления	Количество проб	Процент выявления, В зависимости от срока заболевания			
					1 неделя, %	2 неделя, %		3 и более недель, %
1	Больные с разными диагнозами	163	100	130	13,3±4,2	26,1±3,3	39,4±3,16	79,8 ±3,14

Таблица 4

Выявление специфического IgG методом ИФА по сравнению с классическим вирусологическим методом при различных заболеваниях ОВИ

Диагноз	Количество проб	МЕТОД		Процент совпадений, %
		Культуральный	ИФА	
С. Менингит	799	62	49	79,0±1,44
ОКИ	152	45	37	70,3±3,70
ОРВИ	323	56	42	75,0±2,41
Всего проб	1274	163	128	77,0±1,18

са IgG к энтеровирусам есть  $\geq 0,300$  единиц, по разности проценту детей до 3 лет и взрослых можно приблизительно оценить, что в год энтеровирусами дополнительно инфицируется от 1 до 1,5% неинфицированного населения [13]. Учитывая частоту регистрации интеркуррентных инфекций и удельный вес регистрации РНК вирусов Коксаки и ЕСНО среди всего контингента, процент лиц, которые перенесли

инфекцию за год, существенным образом выше. Вместе с тем, это не противоречит полученным результатам, так как они характеризуют прирост в серонегативной части населения. Полученные результаты разрешают рекомендовать комбинированное использование результатов ПЦР и определение IgG антител к антигенам вирусов Коксаки и ЕСНО при подозрении на ЭВИ для ее диагностики (рис.3) [13].

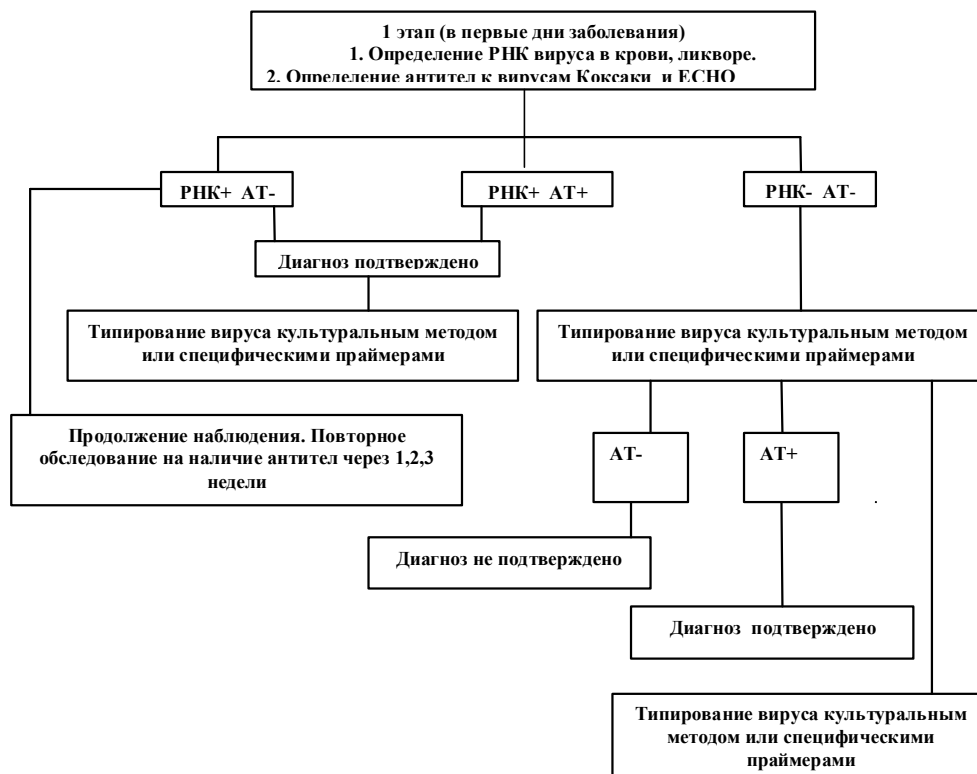


Рис. 3. Схема диагностики ЭВИ в больных с подозрением на энтеровирусную этиологию заболевания

## ВЫВОДЫ

Использование предложенного комплекса тестов позволяет:

1. Оперативно, в течение 12-24 часов, диагностировать или подтвердить энтеровирусную природу заболевания.
2. Определить наличие эпидемически опасных лиц, которые выделяют вирус во внешнюю среду; вирусывыделяющих с бессимптомной или атипичной формой инфекции.
3. Проведение эпидемиологического мониторинга ЭВИ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунология: Практикум. – Киев. - «Высшая школа». - 1989.-296с.
2. Бабенко С.В., Колесникова А.Г., Ектова Л.И., Прилуцкий А.С., Чернуцкий С.О. «Эпидемиологические особенности распространения энтеровирусных инфекций в промышленных регионах» // Университетская клиника. -2008. - том 4 №1. -С. 95-99
3. Колесникова А.Г., Бабенко С.В., Микрюкова Н.Г., Прилуцкий А.С., Чернуцкий С.О. «Удельный вес водного фактора в распространении серозного менингита в донецком регионе» // Университетская клиника. -2008. - том 4 №1. -С. 100-106.
4. Сизяшин Л.П. Андреев И.И. Справочник по клинической иммунологии // М.: Феникс. -2005.-445с.
5. Мухарська Л.М., Хайтович О.Б., Методичні вказівки «Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань людини» // Київ. -2003.-19-56
6. Прилуцкий А. С., Бабенко С. В., Ектова Л. И., и др. Выделение энтеровирусов из объектов окружающей среды и у больных, имеющих различную патологию // Актуальні проблеми акушерства і гінеко-

логії, клінічної імунології та медичної генетики: Збірник наукових праць.- Київ- Луганськ, вип. 5.- 2001.- С. 357-362.

7. Прилуцький О. С., Бабенко С. В., Майлян Е. А. та ін. Циркуляція ентеровірусів та захворюванність окремими формами ентеровірусної інфекції серед дітей Донецького регіону // Українська міжвідомча збірка.- Товариство «Знання».- Київ, Т. 28.- 2001.- С. 120-127.
8. Byington C. L., Taggart E. W., Carroll K. C., et al. A polymerase chain reaction- based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolio enteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger // Pediatrics.- 1999.- Mar.- № 103 (3).- E. 27.
9. Glimaker M., Lindquist L. Enterovirus diagnosis is important, but should be used cautiously // Lakartidningen.- 1999.- Aug. 25.- № 96 (34).- P. 3516-3519.
10. Hadziyannis E., Cornish N., Starkey C. et al. Amplicor enterovirus polymerase chain reaction in patient with aseptic meningitis: a sensitive test limited by amplification inhibitors // Arch. Pathol. Lab. Med.- 1999.- Oct.- № 123 (10).- P. 882-884.
11. Ramers C., Billman G., Hartin M. et al. Impact of diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management // Jama.- 2000.- May. 24- 31.- № 283 (20).- P. 2680-2685.
12. DIAREA.RU – портал о диарее [Электронный ресурс]: Режим доступа к ресурсу.: <http://www.diarea.ru/modules.php?name=News&file=article&sid=5469>.
13. Прилуцький О. С., Бабенко С. В., Майлян Е. А. та ін. Методичні рекомендації. Імунологічна діагностика активності, поширеності ентеровірусної інфекції // Київ 2007 – С. 1-27.