

Хаманова Ю. Б., Сабитов А. У., Сергеев А. Г., Бейкин Я. Б., Резайкин А. В.

Клинико-иммунологическая характеристика менингита, вызванного энтеровирусом Коксаки А9 у детей

Кафедра детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург

Khmanova Y. B., Sabitov A. U., Sergeev A. G., Beykin Y. B., Rezaykin A. V.

Clinical and immunological characteristics of meningitis caused by enterovirus Koxsackie A9 in children

Резюме

Определение этиологического фактора важно для дальнейшей тактики лечения и профилактики серозных менингитов у детей. В статье впервые описаны региональные особенности менингита, вызванного энтеровирусом Коксаки А9. Метод прямого секвенирования участка гена VP4-VP2 позволяет идентифицировать энтеровирусы, которые не выделяются при традиционном вирусологическом исследовании.

Ключевые слова: менингеальная форма Коксаки А9-инфекции у детей

Summary

Evaluation of the primary etiologic agents that cause aseptic meningitis outbreaks may provide valuable information regarding the prevention and management of aseptic meningitis. The article describes the regional clinical and immunological features of serous meningitis caused by an enterovirus Coxsackievirus A9. An outbreak of aseptic meningitis occurred from May to June, 2009, in Ekaterinburg. In order to determine the etiologic agent, CSF specimens from children hospitalized for aseptic meningitis at City Clinical Hospital № 40 were tested for virus isolation and identification. The use of the direct sequencing of gene region VP4-VP2 can identify enteroviruses, which are not allocated in viral culture.

Key words: meningeal form of Coxsackie A9 - Infection in Children

Введение

Актуальность проблемы энтеровирусной инфекции обусловлена множеством серотипов; отсутствием вакцинации, высокой способностью энтеровирусов к мутации [1-4]. Энтеровирусы явились причиной новых типов болезни, таких как, геморрагического увеита, ящуроподобного синдрома, энцефаломиелита. И не исключаются возможность, что в ходе эволюции они могут занять бывшую экологическую нишу полиовирусов и стать причиной новых эпидемий и пандемий [8]. В Свердловской области регистрируется высокая заболеваемость энтеровирусными менингитами среди детского населения, которая носит волнообразный характер, с прошлого года наблюдается подъем заболеваемости.

Цель настоящей работы – клинико-иммунологическая характеристика энтеровирусного менингита, вызванного Коксаки А9.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 8 детей с менингеальной формой Коксаки А9-инфекции (СА9), из них от 3-х

до 7 лет – 4 ребенка, от 7 до 14 лет – 4 пациента, госпитализированных в МАУ «ГКБ № 40».

На базе лаборатории молекулярной диагностики кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии (зав. – д.м.н., профессор Сергеев А. Г.) проведено исследование энтеровирусов методом прямого секвенирования участка гена VP4-VP2. Для идентификации энтеровирусов в ликворе использовали ОТ-ПЦП с диагностической системой «Ампли-Сенс Enterovirus-207» (ЦНИИ Эпидемиологии, г. Москва). Идентификацию вирусов проводили методом прямого секвенирования нуклеотидной последовательности, кодирующей белок VP4 и часть белка VP2 на генетическом анализаторе ABI PRISM – 310 (США). Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ проводился с использованием программы MEGA 3.1.

Иммунологические исследования проводились на базе МАУ «Клинико-диагностический центр». Для оценки иммунного статуса содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов определялось с помощью гематологического анализатора Cobas Minos Stex (ABX).

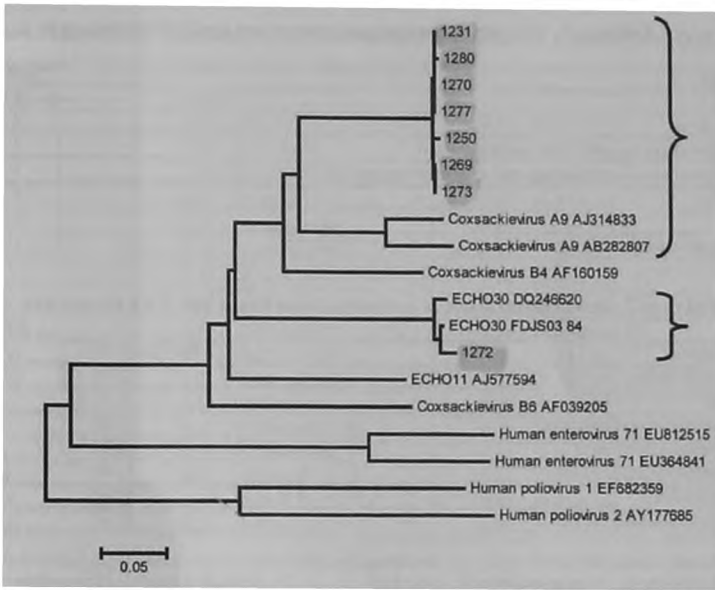


Рисунок 1. Филогенетическое древо для области генома VP4-VP2 (560 п.н.)

Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО "Сорбент" (г. Москва). Регистрация результатов проводилась методом лазерной проточной цитометрии на цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН-γ и ФНО-α Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали РМА ("Sigma", 50ng/ml) плюс иономицин ("Sigma", 1μg/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием ФИТЦ-меченых анти-CD3-моноклональных антител (ООО "Сорбент", г. Москва) РЕ-конъюгированных анти-ИЛ2, ИЛ4, ИФН-γ и ФНО-α-антител (Caltag). Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности лейкоцитов) и поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии Минздрава РФ. Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи спонтанного НСТ-теста (Демин А. А. 1981). Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0.» и «AtteStat», описание количественных признаков проводилось с использованием параметрических и непараметрических методов.

Результаты и обсуждение

Согласно последней версии классификации вирусов, принятой Международным комите-

том по таксономии вирусов в 2003 году в Париже и в 2006 году в Сан-Франциско, энтеровирусы человека сгруппированы в пять видов (полиовирусы и энтеровирусы человека А, В, С, D), входящих в род Enterovirus, который относится к семейству Picornaviridae [5].

Важной особенностью энтеровирусов является высокая частота их мутаций, поскольку полимеразы энтеровирусов не обладают функцией коррекции ошибок, встречающихся при репликации генома [6] и высокая скорость рекомбинации [1]. Генотипы обычно выделяются на основании 15% отличия нуклеотидной последовательности в области VP1-2A. Каждый генотип широко циркулирует, как правило, 8-10 лет, после чего он либо исчезает вообще, либо становится минорным или возвращается через значительный промежуток времени [7].

В нашем исследовании Coxsackievirus A9 был изолирован из ликвора методом прямого секвенирования участка гена VP4-VP2, рисунок 1. Вирус Coxsackievirus A9, обнаруженный у больных, имел общее происхождение, нуклеотидные последовательности наиболее близки к штаммам, циркулировавшим в Восточной Европе в последние годы.

Инкубационный период варьировал от 1 до 10 дней. Клиника менингита, вызванного вирусом Коксаки А9 характеризовалась острым началом болезни с резким подъемом температуры до фебрильных цифр, в первые дни болезни проявлялись головная боль и рвота, которая сохранялась в течение трех дней. Менингеальные симптомы определялись с первого дня и сохранялись в течение четырех-шести дней, сыпь и герпангина не встречалась. Катаральный синдром определялся у одного четырехлетнего пациента продолжительностью три дня (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. Частота клинических симптомов при СА9-менингите

Симптомы	абс.	%
Рвота	8	100
Головная боль	8	100
Полный менингеальный симптомокомплекс	5	62,5
Диссоциированный менингеальный симптомокомплекс	3	37,5
Лихорадка	8	100
Вялость	8	100
Катаральный синдром	1	12,5

Таблица 2. Продолжительность основных симптомов при СА9-менингите, дни

Показатель	Me [Q25-Q75]	
Головная боль	3	[3-4]
Рвота	3	[2-3]
Ригидность мышц затылка	5	[4-6]
Фебрильная лихорадка	3	[1-3]
Субфебрильная лихорадка	2	[1-4]
С-м Кернига	3	[2-6]
С-м Брузинского	3	[2-4]

При диагностической спинно-мозговой пункции ликвор был прозрачный, вытекал под давлением, частыми каплями, медиана плеоцитоза составила 123[29-191] x106/л, при этом у 5 больных преобладал трехзначный плеоцитоз, доминировали нейтрофилы - 54[21-93] x106/л. Содержание белка в ЦСЖ колебалось от 0,1 до 0,6 г/л. На 16-23 день болезни санация ликвора наблюдалась у 4 детей, более длительное течение менингита наблюдалось у половины пациентов.

Иммунологические исследования позволили охарактеризовать состояние врожденного и адаптивного иммунитета при СА9-менингите (таблицы 3 и 4). Как видно из таблицы 3 в остром периоде заболевания изменения врожденного иммунитета характеризовались нейтрофилием и увеличением бактерицидной активности, уменьшением поглотительной активности моноцитов (p<0,05). В периоде реконвалесценции нормализовалось число нейтрофилов, показатели кислородзависимого киллинга были ниже уровня здоровых детей [9].

В острый период заболевания при СА9-менингите в периферическом кровотоке наблюдалась CD3+лимфопения, наряду с увеличением числа Т клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (CD3+HLA-DR+) (p<0,05), таблица 4.

В гуморальном звене регистрировался повышенный уровень Ig M.

Выявлено уменьшение спонтанной цитокинсинтезирующей способности Т-клеток: CD3+TNFα+, CD3+IFNγ+, CD3+IL2+, CD3+IL4+ лимфоцитов. Показатели индуцированного синтеза TNFα CD3+ клетками в течение всего периода наблюдения были повышенными по сравнению с нормой (p<0,001), а число CD3+IFNγ+/ст. – низким.

В динамике к третьей неделе заболевания уровень CD3+-клеток возрос, значения стимулированной и базальной секреции TNFα, IL2, IL4 CD3+лимфоцитами не претерпели существенных изменений по сравнению со стартовыми данными. Рост функциональной активно-

Таблица 3. Показатели врожденного иммунитета при СА9-менингите у детей, Me [Q25-Q75]

Показатель, x10 ⁹ /л	1 исследование		2 исследование		p
Лейкоциты	8,00	[7,15-8,95]	7,40	[6,50-8,40]	
Нейтрофилы	3,85	[3,35-5,20] †*	2,90	[2,40-4,8]	0,04
Моноциты	0,32	[0,30-0,34]	0,30	[0,30-0,40]	
НСТсп, %	7,50	[5,50-9,50]	4,67	[3,00-6,00] †*	
НСТст, %	12,25	[7,00-17,50]	14,67	[10,00-18,00]	
БА, %	36,43	[31,45-41,40] †*	29,37	[23,10-35,60]	
Аф моноцитов	0,27	[0,24-0,30] †*	0,26	[0,26-0,26]	
АФ мон%	82,50	[76,95-88,05]	85,70	[79,00-92,30]	
АФ нейтрофилов	3,36	[2,84-3,88]	2,29	[2,29-2,29]	0,04
АФ ней%	91,23	[89,60-92,85]	87,10	[83,90-91,80]	
NK	0,35	[0,13-0,57]	0,36	[0,36-0,36]	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ IFNγ ⁺ /ст.	0,06	[0,04-0,08] †*	0,05	[0,03-0,06] †*	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ IFNγ ⁺ /сп.	0,003	[0,0021-0,0041]	0,0031	[0,0002-0,0046]	

Примечание - значимость различий при сравнении показателей: †↓* - с группой здоровых детей [9], p<0,05; p - значимые различия между группами в динамике.

Таблица 4. Показатели адаптивного иммунитета СА9-менингите у детей, Ме [Q25-Q75]

Показатель, $\times 10^6/\text{л}$	1 исследование	2 исследование	p
CD 20 ⁺	0,39 [0,27-0,52]	0,41 [0,21-0,61]	
Ig A, г/л	1,23 [0,85-1,60]	1,03 [0,50-1,80]	
Ig M, г/л	1,43 [1,25-1,60] ↑*	1,13 [0,70-1,70]	
Ig G, г/л	11,25 [9,40-13,10]	7,90 [6,90-9,10]	
ЦИК, ед.	54,33 [17,00-102,00]	40,67 [14,00-92,00]	
CD 3 ⁺	1,72 [1,52-1,93] ↓*	2,25 [1,85-2,40]	0,03
CD 4 ⁺	0,94 [0,74-1,15]	1,10 [0,90-1,20]	
CD 8 ⁺	0,65 [0,45-0,86]	0,75 [0,60-0,96]	
CD3 ⁺ HLADR%	1,79 [0,29-3,30] ↑*	2,32 [2,32-2,32] ↑*	
CD3 ⁺ TNFα ⁺ /ст.	0,56 [0,52-0,59] ↑*	0,63 [0,33-1,07] ↑*	
CD3 ⁺ TNFα ⁺ /сп.	0,02 [0,007-0,028] ↓*	0,01 [0,01-0,02] ↓*	
CD3 ⁺ IL2 ⁺ /ст.	0,29 [0,12-0,44]	0,28 [0,09-0,52]	
CD3 ⁺ IL2 ⁺ /сп.	0,01 [0,004-0,012] ↓*	0,01 [0,00-0,02] ↓*	
CD3 ⁺ IL 4 ⁺ /ст.	0,03 [0,020-0,037]	0,02 [0,01-0,03]	
CD3 ⁺ IL 4 ⁺ /сп.	0,01 [0,007-0,015] ↓*	0,01 [0,01-0,01] ↓*	
CD3 ⁺ IFNγ ⁺ /ст.	0,32 [0,26-0,37] ↓*	0,41 [0,25-0,64]	
CD3 ⁺ IFNγ ⁺ /сп.	0,02 [0,004-0,03] ↓*	0,01 [0,005-0,015] ↓*	

Примечание – значимость различий при сравнении показателей: ↑↓ – с группой здоровых детей [9], p<0,05; p – значимые различия между группами в динамике.

сти CD3⁺IFNγ⁺-, CD3⁺IL2⁺-, CD3⁺TNFα⁺-, CD3⁺IL4⁺-клеток в острый период и период реконвалесценции проявлялся увеличением коэффициента стимуляции этих субпопуляций лимфоцитов по сравнению со здоровыми детьми [9] (p<0,001), рисунок 2.

Приводим клинический пример СА9-менингита, развившегося у ребенка школьного возраста. Больной М., 11 лет. Заболел 27 июня с появления резкой головной боли. На следующий день головная боль сохранялась, отмечалась трехкратная рвота, повышение температуры тела до 39,2°С, в связи с чем ребенок был госпитализирован бригадой скорой помощи. Из эпиданамнеза: контакты с инфекционными больными отрицает, купался в бассейне на дачном участке, расположенном в Чкаловском районе г. Екатеринбурга.

Состоит на диспансерном учете по поводу бронхиальной астмы (легкой степени), на момент госпитализации фоновое заболевание вне обострения, терапии не получает. Профилактические прививки сделаны соответственно возрасту.

При осмотре состояние среднетяжелое, температура 38,3°С. Кожа чистая. Гиперемия лица, язык обложен

белым налетом у корня. Носовое дыхание свободное. Шейные лимфоузлы единичные, мягкие, безболезненные. В легких дыхание везикулярное. Тоны сердца громкие, ритмичные, ЧСС 84 в мин. Выраженная ригидность мышц затылка, положительные симптомы Кернига, Брудзинского (верхний и нижний). Со стороны черепно-мозговых нервов и рефлекторной сферы патологии не обнаружено. Проведена диагностическая спинномозговая пункция: ликвор прозрачный, частыми каплями, плеоцитоз 234х106/л (78% лимфоцитов), белок – 0,23 г/л. Обнаружена РНК энтеровируса из ликвора методом полимеразной цепной реакции. В дальнейшем, при прямом секвенировании участка гена VP4-VP2 был подтвержден генотип Coxsackievirus A9.

Анализ крови: Нв 152 г/л, лейкоциты – 6,6х109/л, нейтрофилы- 53%, эозинофилы-7%, лимфоциты-36%, моноциты-4%, СОЭ 16 мм/ч. При вирусологическом исследовании носоглоточных смывов и фекальных проб, серологическое исследование – результат отрицательный.

В динамике фебрильная лихорадка сохранялась 4 дня, повторная рвота – 2 дня. Менингеальные симпто-

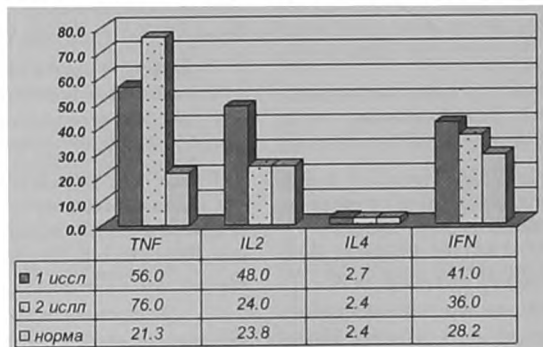


Рисунок 2. Значения коэффициентов стимуляции CD3⁺-клеток у детей

мы отмечались до 6 дней. На 27-й день болезни проведена контрольная спинномозговая пункция: ликвор прозрачный, плеоцитоз 16х10⁶/л (90% лимфоцитов), белок – 0,10 г/л.

Иммунограмма: Ig A-1,8г/л; Ig M-1,7г/л; Ig G-7,7г/л. CD3+-1,77х10⁹/л, CD4+-0,86х10⁹/л, CD8+-0,70х10⁹/л.

CD3+IL2 +/ст.- 0,10х10⁹/л, CD3+IFNγ+/ст.-0,34х10⁹/л.

Натуральные киллеры (CD3-CD16+CD56+IFNγ+/ст.-0,05х10⁹/л).

Возможно, что у мальчика медленная санация ЦСЖ (на 27-й день болезни) была обусловлена иммунной дисфункцией: при нормальном уровне иммуноглобулинов и CD3+, CD4+, CD 8+лимфоцитов отмечалось снижение функциональной активности цитокинсодержащих клеток, являющихся основными регуляторами клеточного иммунитета, таких как CD3+IL2 +/ст. и CD3+IFNγ+/ст. и натуральных киллеров.

Заключение

Таким образом, менингеальная форма Коксаки А9-инфекции характеризовалась острым началом с резким подъемом температуры до фебрильных цифр, в первые дни болезни проявлялись головная боль и рвота, менингеальные симптомы определялись с первого дня и сохранялись в течение четырех-шести дней. Медiana плеоцитоза составила 123х10⁶/л, доминировали нейтрофилы. На 16-23 день болезни санация ликвора наблюдалась у 4 детей, более длительное течение менингита наблюдалось у половины пациентов.

Развитие Коксаки А9-менингита у детей характеризовалось изменениями со стороны врожденного иммунитета: нейтрофилезом и увеличением бактерицидной активности на фоне уменьшения поглотительной активности моноцитов. В периоде реконвалесценции нормализовалось число нейтрофилов, показатели кислородзависимого киллинга были ниже уровня здоровых детей.

Изменения адаптивного иммунитета проявлялись увеличением уровня Ig M на фоне Т-лимфопении. Цитокиновый профиль CD3+-клеток при Коксаки А9-менингите характеризовался снижением содержания Т-лимфоцитов, спонтанно синтезирующих IFNγ, TNFα, IL2, IL4.

Однонаправленное снижение численности CD3+-клеток, спонтанно продуцирующих цитокины отражает двоякий путь: затраты при развитии воспаления и формирование иммунного ответа (гуморального первичного ответа, увеличение CD3+HLA-DR+-лимфоцитов и уровня Ig M), а высокие показатели индуцированных CD3+TNFα+-лимфоцитов указывают на формирование клеточного иммунитета. Полученные данные свидетельствует о антигениндуцированной модуляции иммунного ответа и возможно, объясняет различия в клинической картине. ■

Ю. Б. Хаманова, д.м.н., доцент кафедры детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург; А. У. Сабитов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург; А. Г. Сергеев, д.м.н., заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург; Я. Б. Бейкин, д.м.н., профессор, главный врач МАУ «Клинико-диагностический центр» г. Екатеринбург; А. В. Резайкин ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Хаманова Ю. Б., 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д.3, ГОУ ВПО УГМУ Минздрава России, кафедра детских инфекционных болезней и клинической иммунологии. Телефон: (343)266-95-37, E-mail: hamanub@gmail.com

Литература:

1. Агол В. И. Непостоянство генома пикорнавирусов / Молекулярная биология. 2002; 2: 286–295.
2. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements / P. Muir, U. Kammmerer, K. Korn [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. 1998; 1: 202–227.
3. Бочаров Е.Ф., Ерман Б.А., Фомин В.В. и соавт. Энцефаловирусная инфекция: Новые аспекты. Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение; 1990
4. Учайкин Г.Ф., Протасяня И.Н., Резник Е.В. и др. Энтеровирусные менингиты у детей Хабаровска в конце 20-го столетия. Эпидемиология и инфекц. болезней. 2003; 2:42–46.
5. Таксономия вирусов [Электронный ресурс] / Режим доступа : http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009. – 10.02.2011.
6. Ward C. D. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome / C. D. Ward, J. V. Flanagan // J. Virol. 1992; 6: 3784–3793.
7. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements / P. Muir, U. Kammmerer, K. Korn [et al.] // Clin. Microbiol. Rev.1998; 1: 202–227.
8. Cherry J.D., Nielsen K.A. Aseptic meningitis and viral meningitis. - In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler G.J., Kaplan S.L. (eds.). - WB Saunders, Philadelphia, 2004; 1:497-505.
9. Характеристика иммунного статуса здоровых детей дошкольного возраста / Я. Б. Бейкин, Ю. Г. Лагерева, Л. В. Богданова [и др.] // Адаптационно-компенсаторные иммунологические реакции в норме и патологии у детей: сб. науч. статей / Под ред. В. В. Фомина, А. И. Ольховикова, С. А. Царьковой [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во УГМА, 2003; 25–31.