

УДК 578.835.15:578.835.17: 578.24:578.52

В.П. Широбоков¹, В.В. Бобир¹, С.І. Доан², А.М. Щербинська², В.А. Понятовський¹, Л.В. Долінчук¹**ПОШИРЕНІСТЬ КИШКОВИХ ВІРУСІВ У ХВОРИХ З ВІЛ-ІНФЕКЦІЄЮ**¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України²ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України"

Досліджена поширеність ентеровірусів та інших кишкових вірусів у хворих з ВІЛ / СНІД, визначений видовий спектр виділених вірусів, порівняно вивчені їх властивості. За результатами досліджень зроблено припущення, що кишкові віруси, зокрема, ентеровіруси у хворих з ВІЛ / СНІД не викликають опортуністичних інфекцій.

Ключові слова: ентеровіруси, Норфолк, культура клітин, полімеразна ланцюгова реакція.

Поліовіруси є найбільш патогенною групою ентеровірусів, вони є збудниками поліомієліту, що загрожує життю розвитком гострих паралічів. Масове використання вакцин Солка і Себіна протягом останніх 50 років призвело до викорінення хвороби у розвинених країнах світу. Згідно резолюції асамблеї ВООЗ, передбачалося провести ліквідацію поліомієліту в світі до 2000 року. Цей термін був продовжений у зв'язку із необхідністю вирішення складних питань наукового та практичного характеру.

Не зважаючи на прийняті рішення та масову імунізацію населення живою поліомієлітною вакциною, проблема поліомієліту продовжує залишатися актуальною. На даний час в Україні триває циркуляція вакцинних штамів вірусу поліомієліту, виділяються віруси Коксакі, ЕСНО та діагностуються нозологічні форми спричинених ними захворювань [2, 6].

Попередніми багаторічними дослідженнями, проведеними на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О. Богомольця, було встановлено, що ентеровіруси здатні впливати на імунну відповідь до гетерологічних антигенів (особливо з позиції імуноорганотропізму). Показано, що віруси поліомієліту здатні спричинити імуномодулюючі ефекти — пригнічувати синтез антитіл до дифтерійного та правцевого анатоксину. Імунна відповідь до вірусів поліомієліту зазнає ушкодження від імуносупресивного впливу АКДП. На кафедрі мікробіології, вірусології та імунології виконані також масштабні дослідження поширеності ентеровірусів на території України [3–5].

ВІЛ-інфекція супроводжується різким пригніченням імунної системи [7]. На пізніх стадіях розвитку хвороба супроводжується так званими СНІД-асоційованими інфекціями, які вважаються проявом СНІДу. Не виключається, що при ВІЛ-інфекції відбувається активізація патологічних процесів, спричиненими ентеровірусами [1].

Метою роботи було дослідити питання поширення ентеровірусів у хворих на ВІЛ/СНІД, встановити видовий спектр, вивчити їх біологічні властивості у порівнянні з ентеровірусами, виділеними від контрольної групи осіб.

Матеріали і методи:

Матеріалом для дослідження слугували фекальні маси, отримані від осіб з ВІЛ/СНІД, які знаходились на лікуванні в Центрі профілактики СНІДу. Пацієнти представляли різні вікові групи. Загалом від осіб ВІЛ/СНІД було отримано 49 зразків фекальних мас. З них, 22 зразки від осіб віком 17–30 років, 23 зразки від осіб віком 30–45 років і 4 зразки від осіб віком старше 45 років.

Контрольними зразками слугували зразки, які раніше отримані від двох контрольних груп осіб — це особи з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника, найчастіше це особи, які перенесли інфекційне захворювання та проводили лікування антибактеріальними препаратами (контрольна група № 1) та практично здорові люди (контрольна група № 2). Особи від яких було взято матеріал, проживають на території м. Києва та Київської області, а також у Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях. Від контрольної групи осіб загалом було відібрано 54 зразки фекалій, з них 26 зразків від хворих з дисбіозами (вікова категорія 17–45 і більше років) — контрольна група № 1, та 28 зразків, отриманих від практично здорових осіб — контрольна група № 3.

Для проведення експериментальних досліджень використано наступні перещеплювані культури клітин: HEp-2 (Circinnati), RD, L20B, Vero. Усі роботи з культурами клітин проводились у відповідності з методичними рекомендаціями ВООЗ [2].

© В.П. Широбоков, В.В. Бобир, С.І. Доан, А.М. Щербинська, В.А. Понятовський, Л.В. Долінчук

Для імуноферментного аналізу використано тест-систему RIDASCREEN Norwalk-like Virus, виробництва фірми r-Biopharm (Німеччина), дана тест-система передбачає виявлення антигену вірусу Норфолк в фекальних масах людини.

Методика постановки реакції віруснейтралізації для серологічної ідентифікації виділених штамів ентеровірусів принципово не відрізнялась від загальноприйнятої [2]. В роботі були використані моно- та полівалентні сироватки виробництва Інституту поліомієліту і вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН.

Генетичні методи дослідження ентеровірусів проводились у лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця. Методологія виділення РНК та проведення зворотної транскрипції не відрізнялась від загальноприйнятої [6] і відповідала вимогам виробника. Ампліфікацію вірусної кДНК проводили на багатоканальному ампліфікаторі "Perkin Elmer" (США) за звичайною методикою в об'ємі 25 мкл. В реакції використовували реактиви ("Медбіосервіс", Україна). В режимі ампліфікації було здійснено 40 автоматичних циклів.

Наявність та якість ПЛР-продуктів аналізували методом гель-електрофорезу, який проводили у 1,5% агарозному гелі в однократному трис-ацетатному буфері рН 8,5 (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М EDTA), що містив 0,5 мкг/мл етидія броміду (2,7-діаміно-10-етил-9-фенілфенантрідиній бромід).

Отримані кількісні результати досліджень оброблені загальноприйнятими методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням значень середньої арифметичної (М), середньої похибки середньої арифметичної (m), квадратичного відхилення (y), достовірності результатів досліджень (t), достовірності результатів двох серій досліджень (p). Застосовували ПК типу IBM (PENTIUM-4) з використанням пакету програм фірми Microsoft.

Результати та їх обговорення.

Для виявлення цитопатичних агентів, усі зразки були протестовані на культурах клітин: HEp-2, RD, L20B, Vero. Оцінку цитопатогенної дії проводили за системою 4+ під інвертованим мікроскопом, порівнюючи з контролем клітин.

Експерименти дали змогу встановити присутність у деяких контрольних зразках матеріалу цитопатогенних агентів, які проявляють цитопатичну дію в культурах клітин. Цитопатична дія найчастіше розпочиналась через 24–48 годин після внесення досліджуваного матеріалу, супроводжувалась подвійним світлозаломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшим округленням клітин. В усіх зразках взятих від осіб з ВІЛ/СНІД, в яких було виявлено присутність цитопатогенних агентів, цитодеструктивний ефект розпочався через 16–18 годин і проявлявся круглоклітинною дегенерацією моношару.

Результати проведених досліджень (табл. 1) свідчать про те, що у хворих з ВІЛ/СНІД не відбувається зростання частоти виділення цитопатогенних агентів у фекальних масах в порівнянні з згаданими вище контрольними групами, в тому числі і з контрольною групою практично здорових осіб (контрольна група № 2).

Із 49 зразків отриманих від хворих з ВІЛ/СНІД, протестованих на трьох культурах клітин (HEp-2, L 20B та RD), лише у трьох зразках було встановлено присутність цитопатогенних агентів, при чому лише один з них (зразок № 16) проявляв цитопатичний ефект у всіх використаних для роботи клітинних культурах і був узятий від чоловіка 72 років з 4 стадією ВІЛ-інфекції. У двох інших випадках цитопатична дія обмежувалась окремими лініями клітинних культур і була не вираженою. Частота виявлення цитопатогенних агентів у матеріалі, взятому від контрольних осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори

Таблиця 1. Частота реєстрації цитопатогенних агентів у осіб з ВІЛ/СНІД та контрольних груп осіб

Вік пацієнтів	Групи осіб					
	Дослідна група		Контрольна група № 1		Контрольна група № 2	
	Всього зразків	ЦПД	Всього зразків	ЦПД	Всього зразків	ЦПД
17–30 років	22	1	16	3	12	1
30–45 років	23	1	6	1	11	1
Старші 45 років	4	1	4	0	5	0

Примітки: контрольна група № 1 — особи з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника; контрольна група № 2 — практично здорові люди

кишківника, була такою: з 26 взятих для роботи зразків виявлено шість цитопатогенних агентів. У групі клінічно здорових осіб з 28 зразків було виявлено два цитопатогенних агенти.

Наступним етапом досліджень було вивчення природи виявлених агентів, які здатні викликати деструкцію моношару клітин. Орієнтовно, належність виявлених цитопатичних агентів до ентеровірусів можна з'ясувати, провівши їх тестування на культурі клітин L20B — це лінія мишачих клітин, що створена методами генетичної інженерії і наділена рецепторами до вірусів поліомієліту.

Для експерименту було відібрано 61 зразок, отриманих від обох контрольних груп та від осіб з ВІЛ, які на культурах клітин проявляли ЦПД. Результати тестування порівнювали з результатами тестування, отриманими на культурі клітин HEp-2. Крім того, для порівняння брали матеріал, який попередньо обробляли ефіром та антибіотиками.

Отримані результати, свідчать про те, що 56% зразків, які проявляли цитопатичний ефект у клітинах HEp-2, здатні давати цитопатичний ефект на клітинах L20B, які є чутливими лише до вірусів поліомієліту. Таким чином, не можна виключати того, що близько половини виявлених цитопатогенних агентів представлені вірусами поліомієліту 1, 2 або 3-го типу. Крім того, результати досліджень дають підстави стверджувати, що після обробки матеріалу антибіотиками, в порівнянні з обробкою ефіром, зростає кількість зареєстрованих цитопатогенних агентів, що може свідчити про те, що серед них, можливо, зустрічаються мікроорганізми, чутливі до даного органічного розчинника.

Видову належність виявлених цитопатогенних агентів визначали у реакції віруснейтралізації з ентеровірусними полівалентними видовими сироватками. Постановка даної реакції проводилась мікрометодом з використанням стерильних 96 лункових планшетів. На кожне зроблене десятикратне розведення вірусомісного матеріалу було взято по дві лунки.

Встановлено, що з чотирьох зразків вірусів, одержаних від осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори (контрольна група № 1), які проявляли цитопатичну дію у культурах клітин, два містили вірус поліомієліту, інші два не вдалося ідентифікувати.

З двох зразків, які були взяті від клінічно здорових осіб (контрольна група № 2) і які проявляли цитопатичну дію у культурах клітин, один нейтралізувався полівалентною поліомієлітною сироваткою, один не нейтралізувався жодною

з використаних сироваток (поліомієлітною, до вірусів Коксакі А, Коксакі В та ЕСНО) і, очевидно, належить до інших вірусів.

З трьох зразків, які були взяті від осіб хворих на ВІЛ/СНІД (основна група) один (зразок № 16) нейтралізувався полівалентною сироваткою, що містила антитіла до вірусів поліомієліту.

Проведені експериментальні дослідження дали змогу встановити, що у хворих з ВІЛ/СНІД не відмічається зростання частоти виділення ентеровірусів у фекальних масах, а видовий спектр виділених цитопатогенних агентів близький до відповідних цитопатогенів, які були виділені від здорових осіб.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення поширення інших кишкових вірусів у хворих на ВІЛ/СНІД, зокрема з'ясування питання поширеності у таких хворих вірусів Норфолк. Дане завдання було реалізовано шляхом постановки імуноферментного аналізу (ІФА), що передбачав виявлення антигену вірусу Норфолк у випорожненнях хворих. Для досліду було відібрано 30 зразків, отриманих від осіб з ВІЛ/СНІД (основна група) та 60 зразків, відібраних від контрольних груп, з них — 30 від дорослих та 30 від дітей до 12 років з попереднім діагнозом "дисбіоз кишківника".

Експерименти дали змогу встановити, що в жодному з 30 досліджених зразків, отриманих від основної групи, не відмічається присутність антигену вірусу Норфолк. Один з досліджених зразків знаходився у так званій "сірій зоні" (Cut-off).

На відміну від основної групи, в контрольній групі, яка складала 60 зразків, виявлено 7 випадків присутності антигену вірусу Норфолк (зразки № 5, 6, 14, 15, 23, 25, 27), при чому усі вони зареєстровані у дітей з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника (контрольна група № 2). Отже, не виключено, що існує прямий зв'язок частоти розвитку дисбіозів кишківника з частотою реєстрації вірусів Норфолк.

Отримані результати експериментальних досліджень свідчать про те, що в осіб з ВІЛ/СНІД не спостерігається зростання частоти виділення інших кишкових вірусів, зокрема вірусів Норфолк. Імунологічні механізми захисту хворих на СНІД від кишкових вірусів потребують подальшого вивчення.

Методи, які основані на використанні ПЛР, характеризуються високою чутливістю і дозволяють провести детекцію безпосередньо геному збудника. Для досліджень було відібрано 30 зразків фекальних мас, отриманих від осіб з ВІЛ та 20 контрольних зразків, отриманих від клінічно здорових осіб. Усі

особливості генетичних досліджень: виділення РНК, зворотна транскрипція, ампліфікація, дослідження продуктів ПЛР за допомогою електрофорезу в агарозному гелі описані у відповідному розділі.

В результаті проведених експериментів з матеріалом від хворих на ВІЛ/СНІД було встановлено присутність ентеровірусної РНК в зразку № 16 (рис. 1). В контрольних зразках було виявлено ентеровірусну РНК у двох випадках (зразок № 12 та зразок № 20 (рис. 2). Таким чином, в результаті проведених молекулярно-генетичних досліджень показано, що частота виявлення ентеровірусної РНК в осіб з ВІЛ не перевищує частоту виявлення ентеровірусної РНК у здорових осіб, що підтверджує результати наших попередніх досліджень.

Експерименти дали змогу встановити, що за структурно-морфологічними особливостями виділені мікроорганізми відповідають морфології ентеровірусів та є простими вірусами, що мають кубічний тип симетрії і розміри близько 30 нм (рис. 3).

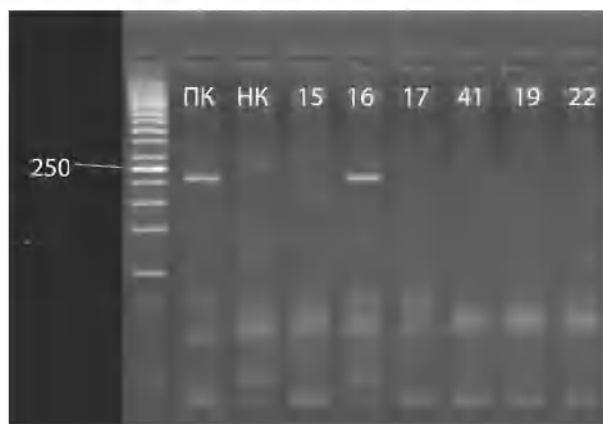


Рисунок 1. Результати електрофоретичного дослідження продуктів ПЛР в агарозному гелі зразків, що отримані від хворих з ВІЛ



Рисунок 2. Результати електрофоретичного дослідження продуктів ПЛР в агарозному гелі зразків, що отримані від контрольної групи осіб

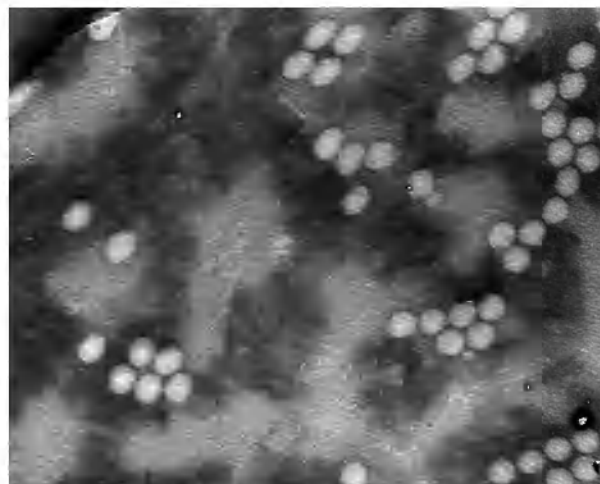


Рисунок 3. Ентеровіруси, виділені від осіб з ВІЛ. Концентрований препарат бентонітом. Контрастування 1% фосфорно-вольфрамовою кислотою (рН 6,0). Електронна мікроскопія, збільшення 60 тис.

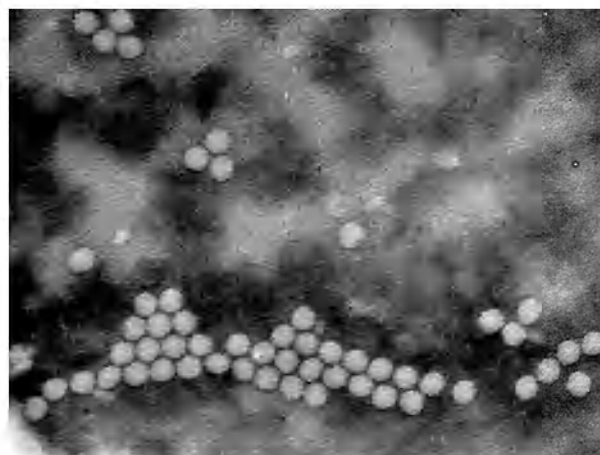


Рисунок 4. Віруси поліомієліту (вакцинний штам, тип 1). Концентрований препарат бентонітом. Контрастування 1% фосфорно-вольфрамовою кислотою (рН 6,0). Електронна мікроскопія, збільшення 60 тис.

Разом з тим, було встановлено, що вони морфологічно не відрізняються від лабораторних штамів. В якості лабораторного штаму було використано вакцинний штам вірусу поліомієліту 1 типу, який пройшов десятки пасажів в лабораторії вірусології кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця (рис. 4).

Висновки

Проведені експериментальні дослідження дозволили вирішити важливе наукове завдання — з'ясувати питання поширеності ентеровірусів та інших кишкових вірусів у хворих з ВІЛ/СНІД, визначити видовий спектр виділених вірусних патогенів, вивчити їх властивості та зробити припущення, що

кишкові віруси, зокрема, ентеровіруси у хворих з ВІЛ/СНІД не викликають опортуністичні інфекції.

У хворих з ВІЛ/СНІД не відмічається зростання частоти виділення ентеровірусів у фекальних масах, а видовий спектр виділених цитопатогенних агентів близький до відповідних цитопатогенів, які були виділені від здорових осіб.

Показано, що в осіб з ВІЛ/СНІД не спостерігається зростання частоти виділення інших кишкових вірусів, зокрема вірусів Норфолк.

Частота виявлення ентеровірусної РНК в осіб з ВІЛ не перевищує частоту виявлення ентеровірусної РНК у здорових осіб, що підтверджує результати наших попередніх досліджень.

Перспектива подальших досліджень. Враховуючи епідемію ВІЛ-інфекції в Україні, збільшення хворих на ВІЛ/СНІД, виникає особлива необхідність подальшого вивчення спектру ентеровірусів, ізольованих від таких осіб та дослідження їх біологічних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Демина А.А. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений / Демина А.А., Нетесов С.В. // Бюллетень СО РАМН. — 2009. — № 6 (140). — С. 116–125.
2. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита. Глобальная программа по вакцинам и иммунизации ВОЗ, Женева. — Москва. — 1998. — 114 с.
3. Ширококов В.П. К патогенезу вирусиндуцированного диабета / Ширококов В.П., Журба Т.Б. // Врачебное дело. — 1986. — № 10. — С. 1–5.
4. Ширококов В.П. Жива поліовірусна вакцина: проблеми подальшого застосування / Ширококов В.П., Корнюшенко О.М., Сичова В.В., Шилов М.В. // Тези IV конгресу світової федерації українських лікарських товариств. — Харків. 1992. — С. 130.
5. Ширококов В.П. До механізму дисоціації ентеровірусів / Ширококов В.П., Костенко І.Г. // Збірка тез доповідей X З'їзду Товариства мікробіологів України (15–17 вересня 2004 р.). — Одеса. — С. 9.
6. Sachse Konrad PCR Detection of Microbial Pathogens / Konrad Sachse, Joachim Frey. // Methods in Molecular Biology. — 2002. — Vol. 216. — 324 p.
7. Sharpstone D. Gastrointestinal manifestation of HIV infection / D. Sharpstone, B. Gazzard // Lancet. — 1996. — Vol. 348. — P. 379–383.

РАСПОСТРАНЕННОСТЬ КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

В.П. Ширококов¹, В.В. Бобыр¹, С.И. Доан², А.М. Щербинская², В.А. Понятовский¹

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца МЗ Украины

²ГУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины".

Исследовано распространённость энтеровирусов и других кишечных вирусов у больных с ВИЧ/СПИД, определен видовой спектр выделенных вирусов, сравнительно изучены их свойства. Сделано предположение, что кишечные вирусы, в частности, энтеровирусы у больных с ВИЧ / СПИД не вызывают опортуністические инфекции.

Ключевые слова: энтеровирусы, Норфолк, культура клеток, полимеразная цепная реакция.

ENTERIC VIRUSES HAVE SPREAD THE WORD HIV-INFECTED PATIENTS

V.P. Shyrobokov¹, V.V. Bobyr¹, S.I. Doan², A.M. Shcherbinskaya², V.A. Poniatowski¹

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца МЗ Украины

²ГУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины".

Prevalence of enteroviruses and other enteric viruses in patients with HIV/AIDS was investigated, the species range selected viruses was identified, their properties relatively was studied. It is suggested that enteric viruses, particularly enteroviruses in patients with HIV / AIDS do not cause opportunistic infections.

Key words: enterovirus, Norfolk, cell culture, polymerase chain reaction.

Рецензент: д.мед.н., професор В.І. Бондаренко