

Можливості сучасної лабораторної діагностики щодо встановлення етіології сезонних спалахів гострих респіраторних вірусних інфекцій

Б.О. ПОНУР, І.Г. КОСТЕНКО, О.С. ПУГАЧЕНКО

м. Київ

У період епідемії грипу проводилися лабораторні обстеження хворих на наявність у їх біоматеріалі основних збудників ГРЗ, які приводили до пневмоній з блискавичним перебігом. Дослідження проводилися методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також мікробіологічним методом. Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили на обладнанні MyCycler (BioRad, США) за допомогою комерційних наборів Seeplex®RV12 ACE Detection для виявлення збудників: human adenovirus (AdV), influenza A virus (FluA), influenza B virus (FluB), human respiratory syncytial virus A (RSVA), human respiratory syncytial virus B (RSVB), human metapneumovirus (MPV), human parainfluenzavirus 1 (PIV1), human parainfluenzavirus 2 (PIV2), human parainfluenzavirus 3 (PIV3), human rhinovirus A/B (HRV), human coronavirus 229E/NL63 (229E/NL63), human coronavirus OC43/HKU1 (OC43/HKU1).

Позитивні зразки на influenza A virus відбиралися і проводилася їх ампліфікація з комерційними наборами Seeplex® FluA ACE Subtyping для встановлення найбільш цікавих і розповсюджених субтипів.

Результати мультиплексних зворотньо-транскриптажних ПЛР-досліджень зразків від померлих: з 4-х зразків секційного матеріалу виявлено вірус грипу А. У результаті типування цього вірусу РНК субтипу H1N1 виявлена у 3-х зразках, РНК субтипу H3 в одному випадку. У двох зразках, які містили субтип H1N1, спостерігалися мікстинфекції бактеріально-вірусної етіології.

*У трьох зразках виявлена РНК РС-вірусу. В одного з цих померлих встановлено, що РС-інфекція супроводжувалася бактеріальним збудником (*Haemophilus influenzae*).*

З групи тяжкохворих у 16 пацієнтів не встановлений збудник пневмонії.

За нашими даними, під час епідемії, вірус грипу А зустрічався серед хворих пневмонією у 30% випадків, з них субтип H1N1 виявлено у 25,5% випадків. У 50% хворих з вірусом грипу була зафіксована мікст інфекція.

*Друге місце після вірусу грипу у цієї категорії хворих займав *Streptococcus pneumoniae* (18,2%), найчастіше у вигляді мікст інфекцій.*

Таким чином, результати цієї роботи дозволяють говорити про наявність в Україні восени 2009 року епідемії грипу та інших гострих респіраторних вірусних інфекцій, як у вигляді моноінфекцій, так і у вигляді мікстинфекцій, які приводили до ускладнень і значної кількості летальних наслідків.

Ключові слова: *гострі респіраторні захворювання, пневмонія, мультиплексна зворотня транскрипція-ПЛР*

Гострі респіраторні захворювання (ГРЗ) залишаються актуальними для системи охорони здоров'я багатьох країн всіх континентів. Щорічно в світі реєструється більше одного млрд. хворих на ГРЗ, збудниками яких найчастіше бувають віруси. Більш ніж 200 представників цього

класу можуть інфікувати дихальні шляхи людини. Але до найбільш розповсюджених збудників ГРЗ відносяться: віруси грипу, парагрипу, респіраторно-синцитіальні (РС) віруси, аденовіруси, риновіруси, коронавіруси, метапневмовіруси.

Аденовіруси – ДНК-вмісні віруси, відносяться до родини Adenoviridae. Аденовірусна інфекція проявляється застудними явищами, кашлем, фарингітами, бронхітами, бронхіолітами та типовою пневмонією, а також є дані про деякі випадки атипової пневмонії за участю аденовірусів.

Віруси грипу – РНК-вмісні віруси, що відносяться до родини Orthomyxoviridae. За антигенною структурою віруси грипу поділяють на три типи: А, В і С. Віруси грипу типів А і В викликають майже однаковий спектр захворювань, але потреба в госпіталізації пацієнтів з грипом типу А виникає в 4 рази частіше, ніж з грипом типу В. Відомо, що віруси грипу здатні викликати не лише епідемії але і пандемії. Наслідками ураженням дихальних шляхів вірусами грипу можуть бути фарингіти, бронхіти, бронхіоліти, типова пневмонія. Крім зазначених локалізацій віруси грипу В можуть вражати шлунково-кишковий тракт. Особливістю даної групи вірусів є те, що вони поліорганотропні і здатні призводити до тяжких ускладнень.

Респіраторно-синцитіальні віруси – РНК-вмісні віруси, що відносяться до родини Paramyxoviridae. Відомо два типи РС-вірусів – А і В. РС-вірусні інфекції мають велике значення при запальних процесах нижніх дихальних шляхів у дітей, особливо це стосується РС-вірусу типу А. Тип В частіше викликає захворювання верхніх дихальних шляхів як у дітей, так і у дорослих. В США приблизно 50% дітей інфікуються РС-вірусом, за останні 5 років біля 90 тисяч новонароджених та дітей раннього віку було госпіталізовано, а за рік помирає 4500 дітей віком до 5 років. У дорослих людей, які не мають специфічних антитіл до РС-вірусу, дана інфекція може викликати тяжку пневмонію з летальним наслідком.

Метапневмовірус – РНК-вмісний вірус, що відноситься до родини Paramyxoviridae. Цей вірус викликає як ГРЗ, яке може протікати асимптоматично, так і бронхіти, бронхіоліти та типову пневмонію. За клінічними симптомами метапневмовірусну інфекцію найчастіше важко відрізнити від РС-інфекції.

Віруси парагрипу – РНК-вмісні віруси, що відносяться до родини Paramyxoviridae. Існують чотири типи даних збудників. Кожен з чотирьох типів викликає різну клінічну та епідеміологічну картину. Віруси парагрипу 1 та 2 типів найчастіше викликають ларинготрахеобронхіти, а також інші інфекції верхніх та нижніх дихальних шляхів. Тип 3 найчастіше викликає кашель і займає 2-ге місце (після РС-вірусу) при таких захворюваннях новонароджених, як бронхіти та типові пневмонії.

Риновіруси – РНК-вмісні віруси, що відносяться до родини *Picornaviridae*. Риновіруси виявляються при ГРЗ в 30%, а також реєструється їх участь у етіології бронхітів та пневмоній новонароджених.

Коронавіруси – РНК-вмісні віруси, що відносяться до родини *Coronaviridae*. Здатні викликати інфекції як респіраторного тракту, так і шлунково-кишкового. Коронавіруси викликають різноманітний спектр захворювань – від ГРЗ до атипової пневмонії.

Безумовно, поряд з вірусними інфекціями, бактеріальні збудники відіграють важливу роль серед пневмоній. Так, *Streptococcus pneumoniae* є основним агентом позагоспітальних пневмоній. *Haemophilus influenzae* колонізує назофарингіальні шляхи і викликає захворювання з різноманітними клінічними проявами, такі як: отити, синусити, пневмонії, сепсис, менінгіти. *Bordetella pertussis* є збудником кашлюку. *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* викликають бронхіти та атипові пневмонії.

Зазначені інфекції існують вже давно, однак встановлення їхньої ролі в етіології захворювань у пацієнтів стало можливим тільки з появою нових методів лабораторної діагностики та відповідних якісних тест-систем. Майже всі вірусні захворювання респіраторного тракту мають клінічно схожу симптоматику, тому методи лабораторної діагностики відіграють вирішальну роль в постановці діагнозу. Нема сумнівів, що своєчасна та надійна діагностика необхідна для вибору тактики лікування, раціональної профілактики, епідеміологічного нагляду за розповсюдженням інфекцій.

Останнім часом перспективи вдосконалення лабораторної діагностики пов'язують з використанням методів генодіагностики, а саме полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Переваги цього методу полягають не тільки в найвищій чутливості, але і можливості використовувати будь-який тип біологічного матеріалу.

Так, коли в Україні, в жовтні-листопаді 2009 р. була зафіксована епідемія грипу з високою летальністю, виявлення збудника ГРЗ стало вкрай необхідним для того, щоб лікарі-клініцисти мали уявлення про етіологію, перебіг та прогноз захворювань.

Саме з цією метою в період даної епідемії ми проводили лабораторне обстеження хворих на наявність в біоматеріалі від них основних збудників ГРЗ, які приводили до швидкоплинних пневмоній.

Матеріали та методи

Клінічним матеріалом для лабораторних досліджень від тяжкохворих були: змиви з носа та ротоглотки, харкотиння, а також секційний матеріал (легені) від померлих. Збір матеріалу проводили згідно інструкцій виробника у транспортне середовище (Амплі-Сенс, Росія) з

додаванням ДЕПС (диетілпірокарбонат), а також в транспортне середовище Амієса з активованим вугіллям для подальших мікробіологічних досліджень.

Попередній обробці підлягали секційний матеріал та харкотиння, інший біоматеріал не вимагав попередньої обробки. Секційний матеріал розтирали одноразовими гомогенізаторами для пробірок типу Eppendorf, відбирали надосад, який досліджували. Харкотиння розводили 1:1 реагентом «Муколізін» (Амплі-Сенс, Росія) за 30 хвилин до початку проведення аналізу.

ПЛР базувалась на чотирьох процесах: виділення нуклеїнових кислот, реакція зворотної транскрипції, ПЛР ампліфікація специфічних фрагментів ДНК, детекція результатів в агарозному гелі.

Виділення нуклеїнових кислот (РНК, ДНК) проводили комерційними наборами «Рибо-сорб» (Амплі-Сенс, Росія).

Реакцію зворотної транскрипції виконували за допомогою також комерційних наборів «Реверта-Л» (Амплі-Сенс, Росія) згідно інструкції виробника.

Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили на обладнанні MyCycler (BioRad, США) за допомогою комерційних наборів Seeplex®RV12 ACE Detection (Seegene, Korea). Дані набори основані на новій концепції оліготехнології (DPO), яка забезпечує оптимізацію ПЛР та забезпечує максимальну специфічність ПЛР та чутливість вільну від неспецифічного зв'язування. За допомогою наборів Seeplex®RV12 ACE Detection проводиться так звана мультиплексна ПЛР в результаті якої одночасно накопичуються фрагменти наступних збудників: human adenovirus (AdV), influenza A virus (FluA), influenza B virus (FluB), human respiratory syncytial virus A (RSVA), human respiratory syncytial virus B (RSVB), human metapneumovirus (MPV), human parainfluenzavirus 1 (PIV1), human parainfluenzavirus 2 (PIV2), human parainfluenzavirus 3 (PIV3), human rhinovirus A/B (HRV), human coronavirus 229E/NL63 (229E/NL63), human coronavirus OC43/HKU1 (OC43/HKU1).

Також, позитивні зразки на influenza A virus ми відбирали та проводили їх ампліфікацію з комерційними наборами Seeplex® FluA ACE Subtyping для встановлення найбільш цікавих і розповсюджених субтипів. За допомогою вказаних наборів методом мультиплексного ПЛР виявляються наступні 4 субтипи вірусів грипу А: пандемічний influenza A (H1N1 – свинний), сезонний людини influenza A H1, сезонний людини influenza A H3 та пташиний influenza A H5.

Детекцію результатів проводили методом горизонтального електрофорезу у 3% агарозному гелі на трисацетатному буфері з послідовним документуванням на обладнанні GelDoc (BioRad), США.

Обговорення результатів

Результати мультиплексних зворотньо-транскриптазних ПЛР-досліджень зразків від померлих та хворих на пневмонію представлені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Виявлення нуклеїнових кислот збудників гострих респіраторних захворювань з клінічного матеріалу

Назва збудника	Тип клінічного матеріалу		всього (пацієнтів,%)
	Секційний матеріал із легенів (від 8 пацієнтів)	Мокротиння та змиви з носоківтки (від 47 пацієнтів)	
Adenovirus	0	0	0
Metapneumovirus	0	0	0
Corona virus 229E	1	0	1 (1,8%)
Parainfluenza virus 1	0	0	0
Parainfluenza virus 2	0	2	2 (3,6%)
Parainfluenza virus 3	0	2	2 (3,6%)
Influenza A virus	4	13	17 (30,1%)
Influenza B virus	0	0	0
Respiratory syncytial virus B	3	2	5 (9%)
Respiratory syncytial virus A	0	1	1 (1,8%)
Rhino virus A/B	0	2	2 (3,6%)
Corona virus OC43	0	1	1 (1,8%)
Mycoplasma pneumoniae	0	0	0
Legionella pneumophila	0	0	0
Streptococcus pneumoniae	1	9	10 (18,2%)
Haemophilus influenzae	0	4	4 (7,3%)
Bordetella pertussis	1	2	3 (5,5%)
Chlamydophila pneumoniae	1	3	4 (7,3%)

Група померлих: в 4-х зразках секційного матеріалу легень виявлено вірус грипу А. Типування цього вірусу дало наступні результати: вірусна РНК субтипу Н1N1 виявлена у 3-х зразках, а з одного зразка була одержана нуклеїнова кислота сезонного людського вірусу грипу А субтипу Н3. У двох зразках, що містили субтип Н1N1 спостерігались мікстинфекції бактеріально-вірусної етіології, а у інших 2-х крім зазначеного вірусу не було виявлено НК інших збудників із тих, що діагностувались. Є вірогідність, що то була моноінфекція. В 3-х зразках секційного біоматеріалу було виявлено РНК РС-вірусу. Тільки в одному випадку РС-інфекція супроводжувалась бактеріальним збудником.

Слід зазначити, що етіологічний фактор пневмонії (з тих, що діагностувалися) не був встановлений тільки у одного померлого.

Ситуація по групі тяжкохворих не відрізнялася своєю поліетіологічністю. Важливо те, що у 16 пацієнтів не встановлено збудника пневмонії – ми вважаємо, що мав місце несвоєчасний (неякісний) забір біоматеріалу, або хворобу викликав збудник, що не входить до групи досліджуваних агентів.

Так, за нашими даними, під час епідемії, вірус грипу А зустрічався серед хворих на пневмонію (від сегментарної до тотальної) у 30% випадках, з них субтип H1N1 виявлено у 25,5% випадках. В 50% хворих з вірусом грипу була зафіксована мікст інфекція (рис.1).

Друге місце після вірусу грипу у цієї категорії хворих займав *Streptococcus pneumoniae* (18,2%), найчастіше у вигляді мікстінфекцій (рис.1).

Розподілення збудників по групах моноінфекцій і змішаних інфекцій представлено на рис. 1.

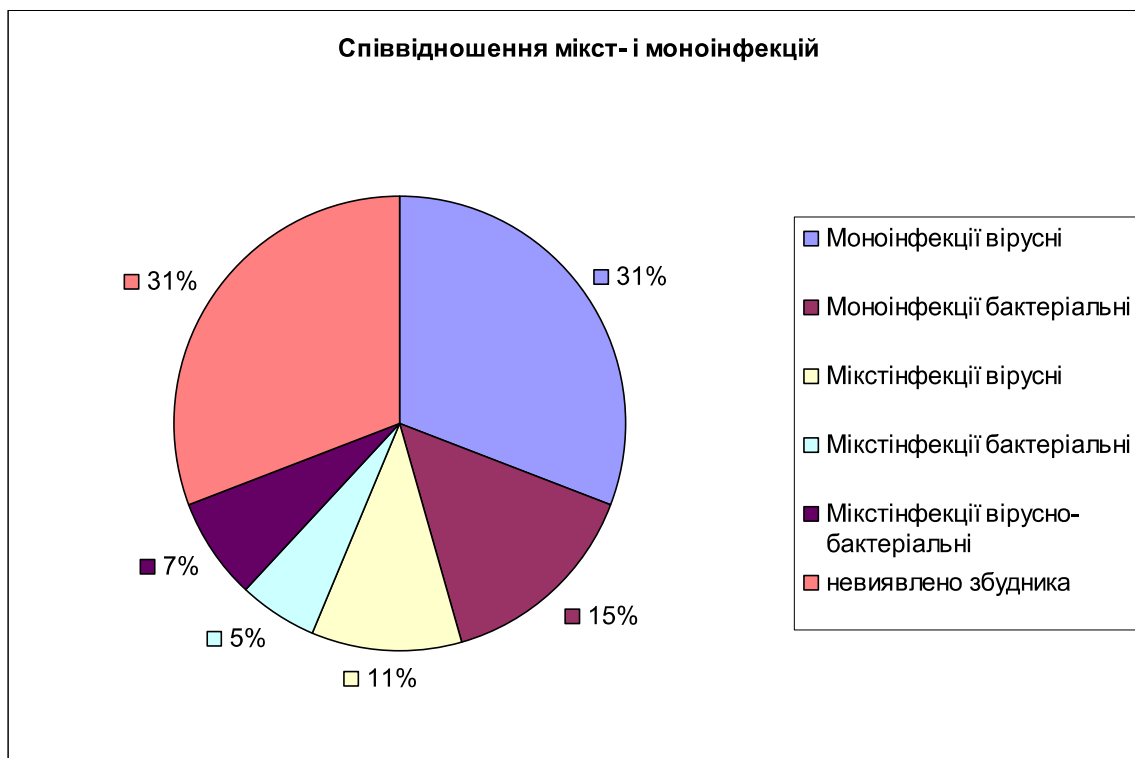


Рис. 1. Співвідношення мікст- і моноінфекцій у групі хворих на ГРЗ та пневмонії.

Отримати зазначені результати нам вдалося за рахунок повноцінної технологічної бази та сучасних високочутливих мультиплексних тест-систем для етіологічної діагностики ГРЗ.

Результати досліджень підтверджують наявність восени 2009 року епідемії грипу та інших гострих респіраторно вірусних інфекцій, що проявлялися, як у вигляді моноінфекцій, так у вигляді мікстінфекцій, які, зокрема, приводили до значної кількості летальних наслідків.

У випадках ГРЗ з однаковою клінічною картиною але з невстановленою етіологією, можливо передбачити циркуляцію збудників, які або не зберігаються без спеціальних стабілізуючих розчинів в біоматеріалі, або їх необхідно ідентифікувати більш складними методами, такими як секвенування.

Висновки

1. Етіологічна розшифровка сезонних спалахів респіраторно-вірусних інфекцій дає можливість вчасно застосовувати етіопатогенетичну терапію, знизити кількість летальних наслідків, прогнозувати перебіг ускладнень та тривалість епідемії грипу.

2. В передсезонний період повинні проводитися не тільки щеплення проти найбільш вірогідних штамів вірусу грипу але й лабораторне (імунологічне) обстеження груп ризику з наданням індивідуальних рекомендацій щодо прийому певних адаптогенів, імуномодуляторів для підвищення резистентності організму до простудних захворювань.

Література

1. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses / S. Bellau-Pujol, A. Vabret, L. Legrand et al. // *Journal of Virological Methods*. – 2005. – Vol. 126. – P. 53–63.

2. Coiras M.T. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assays / M.T. Coiras, P. Perez-Brena, M.L. Garcia, I. Casas // *Journal of Medical Virology*. – 2003. – Vol. 69. – P. 132–144.

3. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays / M.T. Coiras, J.C. Aguilar, M.L. Garcia et al. // *Journal of Medical Virology*. – 2004. – Vol. 72. – P. 484–495.

4. Purkayastha A. Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-4, a human adenovirus causing acute respiratory disease: implication for gene therapy and vaccine vector development / A. Purkayastha, S.E. Ditty, J. Su, [et al.]. // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79 (4). – P. 2559–2572.

5. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples / M.W. Syrmis, D.M. Whiley, M. Thomas et al. // *Journal of Diagnostics*. – 2004. – Vol. 6 (2). – P. 125–131.

6. Gottlieb Scott. Metapneumovirus is a leading cause of respiratory tract infection in infants / S. Gottlieb // *BMJ*. – 2004. – Vol. 328 (246). – P. 7434.

7. Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001-2002 influenza season in israel // *Journal of Clinical Microbiology*. – Vol. 43 (2). – P. 589–595.

8. Easton A.J. Animal Pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis / A.J. Easton, J.B. Domachowske, H.F. Rosenberg // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2004, Apr. – P. 390–412.

9. Available from: www.cbsnews.com/stories/2003/09/16/heath/main573644.shtml.

10. Available from: www.astdhppe.org/infect/rsv.html.

11. Available from: www.answers.com/topic/common-cold.

**Возможности современной лабораторной диагностики
относительно установления этиологии сезонных вспышек острых
респираторных вирусных инфекций**

Б.О. ПОНУР, И.Г. КОСТЕНКО, О.С. ПУГАЧЕНКО

В период эпидемии гриппа проводились лабораторные обследования больных на наличие в их биоматериале основных возбудителей ОРЗ, которые приводили к пневмониям с молниеносным течением. Исследования проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также микробиологическим методом. Амплификацию нуклеиновых кислот проводили на оборудовании MyCycler (BioRad, США) с помощью коммерческих наборов Seeplex®RV12 ACE Detection для выявления возбудителей: human adenovirus (AdV), influenza A virus (FluA), influenza B virus (FluB), human respiratory syncytial virus A (RSVA), human respiratory syncytial virus B (RSVB), human metapneumovirus (MPV), human parainfluenzavirus 1 (PIV1), human parainfluenzavirus 2 (PIV2), human parainfluenzavirus 3 (PIV3), human rhinovirus A/B (HRV), human coronavirus 229E/NL63 (229E/NL63), human coronavirus OC43/HKU1 (OC43/HKU1).

Позитивные образцы на influenza A virus отбирались и проводилась их амплификация с коммерческими наборами Seeplex® FluA ACE Subtyping для установления наиболее интересных и распространенных субтипов.

Результаты мультиплексных обратно-транскриптазных ПЦР-исследований образцов от умерших: из 4-х образцов секционного материала выявлен вирус гриппа А. В результате типирования этого вируса РНК субтипа H1N1 выявлена в 3-х образцах, РНК субтипа H3 в одном случае. В двух образцах, которые содержали субтип H1N1 наблюдались микстинфекции бактериально-вирусной этиологии.

*В трех образцах выявлена РНК РС-вируса. В одного из этих умерших установлено, что РС-инфекция сопровождалась бактериальным возбудителем (*Haemophilus influenzae*).*

Из группы тяжелобольных у 16 пациентов не установлен возбудитель пневмонии.

По нашим данным, во время эпидемии, вирус гриппа А встречался среди больных пневмонией в 30% случаях, из них субтип H1N1 выявлено в 25,5% случаях. В 50% больных с вирусом гриппа была зафиксирована микст инфекция.

*Второе место после вируса гриппа у этой категории больных занимал *Streptococcus pneumoniae* (18,2%), чаще всего в виде микст инфекций.*

Таким образом, результаты этой работы позволяют говорить о наличии в Украине осенью 2009 года эпидемии гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, как в виде моноинфекций, так в виде микстинфекций, которые приводили к осложнениям и значительному количеству летальных исходов.

Ключевые слова: *острые респираторные заболевания, пневмония, мультиплексная обратная транскрипция-ПЦР*

**Possibilities of modern laboratory diagnostics in relation to establishment of
etiology of seasonal flashes of acute respiratory viral infections**

B. PONUR, I. KOSTENKO, O. PUGACHENKO

In the period of epidemic of flu the laboratory inspections of patients on a presence of the basic excitors ARVI, which resulted in pneumonias with the quick as lightning flow, were conducted. Researches were conducted by the method of PCR, and also microbiological method. Amplification of nucleic acids on the MyCycler (BioRad, the USA) equipment by the commercial

sets the Seeplex®RV12 ACE Detection for the exposure of excitors: human adenovirus (AdV), influenza A virus (FluA), influenza B virus (FluB), human respiratory syncytial virus A (RSVA), human respiratory syncytial virus B (RSVB), human metapneumovirus (MPV), human parainfluenzavirus 1 (PIV1), human parainfluenzavirus 2 (PIV2), human parainfluenzavirus 3 (PIV3), human rhinovirus A/B (HRV), human coronavirus 229E/NL63 (229E/NL63), human coronavirus OC43/HKU1 (OC43/HKU1).

Positive standards on influenza A virus was taken away and was conducted their amplification with the commercial sets the Seeplex® FluA ACE Subtyping for establishment of the most interesting and widespread subtypes.

Results of multiplexed PCR-researches of standards from deceased: from the 4th standards of sectional material the virus of flu is exposed A. RNA subtype H1N1 exposed in 3th standards, RNA subtype H3 in one case. In two standards which contained the subtype H1N1 was observed to mixtinfektion bacterial-viral etiology.

In three standards exposed the RNA RS-virus. It is set in one of these deceased, that a RS-infection was accompanied by a bacterial exciter (*Haemophilus influenzae*).

From the group of seriously sicking at 16 patients the exciter of pneumonia is not set.

From our data, during an epidemic, virus of flu A met among patients with pneumonia in 30% cases, from them the subtype H1N1 it is exposed in 25,5% cases. In 50% of patients with the virus of flu was fixed mixtinfektion.

Second seat after the virus of flu at this category of patients was taken by *Streptococcus pneumoniae* (18,2%), mixt of infections is more frequent than all in a kind.

Thus, this job performances allow to speak about a presence in Ukraine in autumn of 2009 year the epidemics of flu and other acute respirator viral infections, as monoinfections, so as mykstinfections, which resulted in complications and far of fatal outcomes.

Key words: acute respiratory disease, pneumonia, multiplex reverse transcription nested-PCR

УДК: 615.322

«ВИН-ВИТА»[®] – эффективный адаптоген и биокорректор иммунных нарушений в организме

В.Г. ПОЯЗИТИС, В.Д. КОВТУН

Одесса

Проанализированы результаты многолетних испытаний природного комплекса высокоактивных биофлавоноидов из кожицы и косточек красных сортов винограда типа «Каберне» – диетической добавки «Вин-Вита»[®]. Показано, что «Вин-Вита» обладает широким спектром биологической активности, оказывает системное действие на организм человека, эффективно повышает неспецифическую сопротивляемость организма человека к вредным воздействиям физической, химической и биологической природы.

Ключевые слова: диетическая добавка, адаптоген, иммуномодулятор, стресс

Результаты исследования, проведенного Киевским международным институтом социологии (КМИС) с 20 августа по 3 сентября 2010 г.,