

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ

*Редько И. И., Овчаренко Л. С.*

*Запорожская медицинская академия последипломного образования*

В данной статье представлены возможности ранней адекватной лабораторной диагностики вирусных инфекций у новорожденных. Показано преимущество метода иммунохроматографического анализа для экспресс-диагностики респираторных вирусных инфекций и модифицированной реакции связывания комплемента для экспресс-диагностики энтеровирусной инфекции над классическими методами определения вирусов.

**Ключевые слова:** новорожденный, внутриутробные респираторные вирусные инфекции, диагностика.

Внутриутробные инфекции остаются актуальной проблемой современной перинатологии и относятся к группе заболеваний, диагностика которых связана с определенными трудностями. Отсутствие специфических клинических проявлений, возможность появления микст-ассоциированных инфекций делают проблему точной верификации возбудителя и определение адекватных подходов к лечению особенно актуальной [1, 8].

Количество возбудителей инфекционных заболеваний при ante-, intra- и перинатальном инфицировании практически неограничено. Однако, одно из первых мест принадлежит возбудителям вирусных инфекций, среди которых наиболее распространенными при беременности являются респираторные вирусы (грипп, парагрипп, аденовирус, респираторно-синцитиальный (РС) вирус), энтеровирусы и вирусы семейства герпеса – вирус простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловирус (ЦМВ).

Особенностью течения данных инфекций у беременных является бессимптомное или субклиническое течение заболевания. Однако, иммунная перестройка, происходящая в организме женщины во время беременности, создает условия для активации латентной инфекции, что увеличивает вероятность внутриутробного заражения плода [1, 3, 8]. Также показателем высокого риска вертикальной передачи вирусов является внутриутробная гипоксия плода, при которой возрастает репродукция в его тканях практически всех вирусов, которые поступают в организм плода на протяжении беременности.

Решающим фактором в характере поражения плода является период, во время которого произошло заражение и продолжительность пребывания вируса в организме. При инфицировании плода в ранние сроки беременности при наличии

острой первичной вирусной инфекции у матери возможны самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды и аномалии развития. При персистирующих вирусных инфекциях, к которым можно отнести грипп, аденовирусную, энтеровирусную инфекции, герпес-инфекции, вызванные ВПГ и ЦМВ, возможно развитие хронической вирусной инфекции у плода, которая может проявиться в виде отсроченной патологии – поражения ЦНС, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы как в периоде новорожденности, так и в течение первого года жизни [3, 6]. Вместе с тем, на основании только клинических данных, диагноз вирусной инфекции может быть только предварительным. Этиологический диагноз невозможен без выявления соответствующих антигенов в биологических субстратах или без выявления динамики антител в сыворотке крови в течение болезни.

Расширение возможности в лечении и профилактике вирусных инфекций у новорожденных (НР) с использованием противовирусных препаратов, иммуномодуляторов с различным механизмом действия также нуждается в быстрой и точной лабораторной диагностике [4, 7].

В зависимости от способов идентификации вируса современные методы лабораторной диагностики могут быть разделены на две группы: прямые, позволяющие обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту непосредственно в клиническом материале, и непрямые, определяющие характер специфического иммунного ответа на воздействие антигенов вирусов.

К прямым методам диагностики относятся: культуральный метод, иммунологические методы: иммунофлюоресцентный, иммуноферментный (ИФА), иммунохроматографический;

молекулярные методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР).

К непрямим (косвенным) методам диагностики относятся серологические методы, основанные на реакции антиген-антитело, и могут быть использованы для определения этиологии вирусной инфекции даже при отрицательных результатах выделения вируса.

Существующие до настоящего времени классические методы выделения респираторных вирусов, в т. ч. и энтеровирусов (культуральный метод, люминисцентная микроскопия, ИФА, ПЦР, РПГА) требуют определенного времени для получения результатов (от 2–3 суток до 4 недель), наличия дорогих реактивов и оборудования, особых условий в вирусологических лабораториях.

В связи с этим обоснованным является использование новых подходов к вирусологической идентификации респираторных вирусов, включая энтеровирусы, позволяющих проводить экспресс-диагностику у НР, особенно в период неблагоприятной эпидемиологической ситуации по гриппу и респираторным вирусным инфекциям, и следить за их циркуляцией у беременных [5, 7].

**Цели и задачи исследования** – изучение возможности применения иммунохроматографического анализа (ИХА) для экспресс-диагностики гриппа, аденовирусной и РС-инфекций, а также модифицированной реакции связывания компонента для экспресс-диагностики врожденной энтеровирусной инфекции.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе родильных домов №№ 5, 9, отделения реанимации родильного дома № 5, отделения патологии новорожденных 1-й детской больницы г. Запорожья в период неблагоприятной эпидемиологической обстановки по респираторным вирусным инфекциям с декабря 2009 года по январь 2010 года.

В ходе исследования обследовано 60 пар «мать-новорожденный» из группы риска по внутриутробной вирусной инфекции (ВУИ) по данным анамнеза и с клиническими проявлениями внутриутробного инфицирования.

Для диагностической идентификации вирусов гриппа А и В, аденовирусов и РС-вирусов использовали метод ИХА. Тестирование проводилось с помощью тестов СITO TEST PS-ADENO, СITO TEST Influenza A+B, предоставленных компанией «Фармаско». Материалом для исследований на грипп, аденовирусную и РС-инфекцию служили мазки-соскобы из носоглотки. Возраст детей при обследовании – от 2-х до 7-и дней. В основе метода ИХА лежит специфическое взаимодействие антигенов и антител на хроматографической мембране после пропитывания ее жидкостью исследуемого образца. Такое взаимодействие происходит в результате диффузного перемещения

окрашенного коллоидным золотом иммунного компонента, который заранее был нанесен на мембрану, и антигенов исследуемого образца. Для визуального выявления специфической иммунной реакции в определенной зоне-линии хроматографической мембраны заранее жестко сорбированы необходимые известные компоненты иммунологических реакций, которые позволяют сконцентрировать краситель в виде окрашенной линии. Наличие красной линии в тестовой зоне свидетельствует о положительной реакции, в то время как отсутствие красной линии указывает на отрицательный результат. В качестве установленной внутренней системы контроля работы теста, красная линия всегда должна появляться в зоне контроля, подтверждая, что необходимый объем образца был нанесен на мембрану и то, что капиллярное пропитывание мембраны осуществилось. Результаты реакции оценивали через 10 минут.

Параллельно всем пациентам было проведено обследование крови из пуповины и периферических вен на грипп методом парных сывороток на выявление прироста антител с интервалом 7–10 дней. Параллельное обследование на РС- и аденовирусную инфекцию проводили методом прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) (тест-системы НИИ им. Пастера, г. С.-Петербург).

Для экспрессной диагностики энтеровирусной инфекции использовали иммунологический метод, основанный на модифицированной РСК (м-РСК) с определением количественного содержания энтеровируса и его серотипа, с помощью стандартных диагностических энтеровирусных поли- и моновалентных сывороток в реакциях ИФА.

Принцип метода заключается в постановке РСК с набором диагностических энтеровирусных сывороток при 2-х часовом их контакте с исследуемым материалом без предварительного титрования, но с применением одного разведения каждого из ингредиента. Модифицированная РСК (м-РСК) позволяет с помощью стандартных диагностических антител к различным серотипам энтеровирусов определять наличие антигенов у больных с энтеровирусной инфекцией и констатировать наличие вирусов в исследуемых биологических материалах. М-РСК обладает важными для поставленных задач характеристиками: позволяет в течение 6–72 часов выявить в фекальных массах и крови антигены энтеровирусов и одновременно определять их типовую принадлежность, что дает возможность проводить обширные исследования всех биологических проб как больных детей, так и взрослых. Это существенно увеличивает процент этиологической расшифровки заболевания.

С помощью представленного метода, следуя классическому принципу выявления и типирования энтеровирусов с использованием поливалентных, а затем моновалентных диагностиче-

ских сывороток, возможно не только в пробах констатировать вирусный антиген, но и определять его принадлежность к типу вируса.

Параллельно использовали классический метод выделения энтеровирусов в тканевых культурах. Материалом для обследования служили кровь и фекалии. Возраст НР на момент обследования от 3 до 14 дней. Всем детям и их матерям проведены также обследования на вирусные герпес-инфекции, вызванные ВПГ и ЦМВ, методом ИФА и ПЦР.

### Результаты исследования и их обсуждение

Изучение данных анализа выявило, что ведущими маркерами внутриутробного вирусного инфицирования были: отягощенный акушерский анамнез – в 85%; хронические инфекции урогенитального тракта – в 53%; отягощенное течение настоящей беременности – все женщины перенесли респираторно-вирусную инфекцию в III триместре; реактивация вирусных TORCH-инфекций – в 45%; угроза прерывания – в 85%; по данным ультразвукового обследования – признаки маточно-плацентарной инфекции – в 65% случаев.

Оценка состояния НР выявила патологическое течение периода ранней адаптации в 70% случаев.

Среди обследованных доношенных НР было 41 (68%), недоношенных – 19 (32%). Переведен в реанимацию 21 (35%) ребенок с диагнозами: СДР – 16 (76%), врожденная пневмония – 11 (52%); в отделение патологии НР переведено 39 (65%) детей. Основные диагнозы в ОПН: поражение органов дыхания в виде пневмоний – 6 (15,3%), бронхиты – 11 (28%), ринофарингиты – 5 (12,8%); поражение сердечно-сосудистой системы (кардиты) – у 57%, функциональные поражения гепатобилиарной системы – у 85%, локальные гнойно-воспалительные заболевания – у 35%, поражения ЦНС – у всех детей, преимущественно в виде синдромов вегето-висцеральных нарушений, повышенной нервно-рефлекторной возбудимости.

Этиологическая верификация ВУИ выявила маркеры гриппа у 2 (3,3%) детей и их матерей, аденовирусную инфекцию – у 5 (8,3%), РС-инфекцию – у 3 (5%), энтеровирусную инфекцию – у 11 (18,3%). Маркеры ЦМВ-инфекции выявлены у 9 (15%) обследованных пар, ВПГ-инфицирования – у 5 (9,3%), микст-инфицирование (ЦМВ+ВПГ) – 47% (табл. 1).

Ассоциации респираторных и герпес-вирусов определили у 21 (35%) детей: в виде ассоциированных форм – у 12 (57%) и в виде моноформ – у 9 (43%) (табл. 1).

В ходе параллельного обследования на грипп методом парных сывороток, на аденовирусную и РС-инфекции методом ПИФ, результаты были сопоставимы с результатами, полученными при ИХА (табл. 2).

Как видно из таблицы, совпадение положительных результатов исследований, проведенных методом ИХА и ПИФ, а также методом парных сывороток, наблюдается во всех случаях.

В данном исследовании проведены сопоставления между выявлением и типированием энтеровирусов в м-РСК и классическим методом выделения вируса в тканевых культурах (табл. 3).

В среднем совпадение результатов составило 85%.

Сравнивая техническую сторону выполнения представленных методик диагностики респираторных вирусных инфекций, хочется отметить, что метод ПИФ требует немало рабочего времени для предварительного приготовления реактивов, реагентов и наличия люминисцентного микроскопа. Серодиагностика методом парных сывороток требует достаточно много времени на получение окончательного результата и является достаточно инвазивным методом для новорожденных.

Несомненным преимуществом метода ИХА является удобство проведения («у постели больного»), легкость и наглядность трактовки результатов, быстрый результат теста (10 минут) и его точность.

Метод диагностики энтеровирусной инфекции с использованием культуры клеток является информативным, но длительный срок проведения (28 дней), высокая стоимость, определенные условия выполнения не позволяют использовать его как метод экспресс-диагностики.

### Выводы

1. Увеличение количества микст-инфекций вирусно-вирусной этиологии (респираторно-герпетические ассоциации) мотивирует проведение ранней, адекватной лабораторной диагностики с учетом повышения эффективности и уменьшения стоимости диагностики.

2. Этиологическая верификация внутриутробной вирусной инфекции требует параллельного обследования матери и новорожденного.

3. Метод иммунохроматографического анализа для диагностики гриппа, РС- и аденовирусной инфекции у новорожденных можно рекомендовать как метод экспресс-диагностики ввиду высокого процента совпадения результатов по сравнению с методом ПИФ и серодиагностикой.

4. Преимуществом ИХА является постановка пробы без транспортировки – «у постели больного», быстрый и точный результат теста.

5. Метод модифицированной РСК является методом экспрессной диагностики энтеровирусов по времени. Преимуществом метода является быстрый результат, выявление не только вирусного антигена, но и его типовой принадлежности, что увеличивает процент этиологической расшифровки заболеваний.

Таблиця 1

## Характер вирусных инфекций у обстежених новонароджених

	Вирусы	Общее количество (n=21) Абсолютное количество
Ассоциированные формы, n=12 (57%)	Грипп+ЦМВ+ВПГ	2
	PS+ЦМВ+ВПГ	1
	АД+PS	3
	АД+PS+ЦМВ+ВПГ	1
	АД+ЦМВ	1
	PS+ЦМВ	2
	ЭИ+ЦМВ+ВПГ	1
Моноформы, n=9 (43%)	ЭИ+ЦМВ	1
	ЭИ	9

Таблиця 2

## Сопоставление результатов ИХА, методов ПИФ и серодиагностики (парные сыворотки)

Результаты анализа	ИХА			Серодиагностика	ПИФ	
	грипп	АД	PS	грипп	АД	PS
Положительный	2	5	3	2	5	3
Отрицательный	58	55	57	58	55	57

Таблиця 3

## Сравнительное выявление энтеровирусного антигена в биологическом материале от больных с энтеровирусной инфекцией в классическом методе в культуре ткани и с помощью модифицированной РСК

Использование диагностических сывороток к серотипам энтеровирусов	Типирование в классическом методе в культуре ткани					Типирование в м-РСК
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки	7-е сутки	Величина оптической плотности
Коксаки В 1-6	-	++ +	+++ +++	+++ +++	++++ ++++	0,507
ЕСНО 1-6	-	++	++ ++	++++ ++++	++++ ++++	0,493
ЕСНО 7-13	-	++	++ +++	+++ +++	++++ ++++	0,487
ЕСНО 14-24	+ -	++ +	+ ++	++ ++	+++ +++	0,502
ЕСНО 25-32	- -	- -	- -	- -	- -	0,468
Энтеро 68-71	- -	++ +	+++ +++	++++ +++	++++ ++++	0,468
Контроль комплемента						0,511

## Литература

1. Внутритропные инфекции и патология новорожденных / Под ред. К. В.Орехова. – М.: Медпрактика, 2002. – 252 с.
2. Значение вертикальной передачи энтеровирусов в эпидемиологии врожденных вирусных инфекций / Лозовская Л. С., Хелленов Э. А., Шумская Е. А., Мухитдинова З. А. // Акушерство и гинекология. – 1995. – № 2. – С. 26–30.
3. Лозовская Л.С., Коноплева Т.Н. и др. Патология матери, плода и ребенка, связанная с вирулентными энтеровирусами, передающимися вертикально // Педиатрия. – 1998. – № 4. – С. 11–16.
4. Методи лабораторної діагностики грипу та гострих респіраторних інфекцій: Методичні рекомендації. – Київ, 1998. – 7 с.
5. Овчаренко Л. С. Застосування швидких імунографічних тестів для діагностики респіраторних вірусних інфекцій (грип, аденовірусна інфекція) у дітей ран-

- нього віку: Інформаційний лист / Л. С. Овчаренко, І. І. Редько, Н. В. Жихарева. – К., 2008. – 4 с.
6. Охотникова И. М., Агейкина В. А., Лозовская А. С. Значение внутриутробной вирусной инфекции в органной патологии детей грудного возраста // Медицинский научный и учебно-методический журнал. – 2001. – № 5. – С. 81–87.
  7. Ширококов В. П., Дзюблик І. В., Дорошенко С. Г. та ін. Застосування швидких тестів у лабораторній діагностиці інфекційних хвороб: Методичні рекомендації. – Київ, 2004. – 32 с.
  8. Шуцько Є. Є., Лакша О. Т. Проблема перинатальних інфекцій у сучасній неонатології // Нова медицина. – 2002. – № 1. – С. 30–35.

## СУЧАСНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВНУТРІШНЬОУТРОБНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

**Редько І. І., Овчаренко Л. С.**

*Запорізька медична академія післядипломної освіти*

В даній статті висвітлено можливості ранньої адекватної лабораторної діагностики вірусних інфекцій у новонароджених. Показано перевагу методу імунохроматографічного аналізу для експрес-діагностики респіраторних вірусних інфекцій та модифікованої реакції зв'язування комплекменту для експрес-діагностики ентеровірусної інфекції над класичними методами визначення вірусів.

**Ключові слова:** новонароджений, внутрішньоутробні респіраторні вірусні інфекції, діагностика.

## MODERN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS OF INTRAUTERINE RESPIRATORY VIRAL INFECTION IN NEWBORN

**Redko I. I., Ovcharenko L. S.**

*Zaporizhzhya Medical Academy of Postgraduate Education*

In given clause it is shined opportunities of application of a method immunochromatographic analysis for a influenza and adenovirus infection. Positive influence of application and predominantion of the given method over straight immunofluorescentia on increase of a level of duly purpose of treatment is shown.

**Keywords:** newborn, intrauterine respiratory virus infection, diagnosis.