

*О.С. Прилуцький, А.Г. Колеснікова, С.В. Бабенко***МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ***Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, Україна*

Реферат. Проведена порівняльна оцінка специфічності та чутливості тест-системи полімеразної ланцюгової реакції зі специфічним праймером до ДНК 207 п. н. (5'-нейтрансльованої) області геному ентеровірусів для всіх типів ентеровірусів (крім вірусу поліомієліту) в порівнянні з класичним культуральним методом. Запропонований методологічний підхід спільного використання тест-системи полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу з визначенням антитіл класу G до вірусів Коксаки та ЕСНО.

Ключові слова: ентеровірусні інфекції, ентеровіруси, захворюваність, полімеразна ланцюгова реакція, імуноглобуліни G, епідеміологічний нагляд

Унаслідок сертифікації України в складі Європейського регіону як території, вільної від «диких» поліовірусів, проблема ентеровірусних інфекцій (ЕВІ) набуває особливої актуальності. Враховуючи такі біологічні властивості ентеровірусів (ЕВ), як нейровірулентність, широкий спектр тканинного тропізму, мінливість, здатність до тривалого виживання в об'єктах навколишнього середовища, виникає необхідність вивчення особливостей епідемічного процесу ЕВІ в період здійснення активних заходів, спрямованих на ліквідацію поліомієліту. Надзвичайно важливою є оптимізація системи епідемічного нагляду за ЕВІ до сучасних умов, [1] вкрай актуальною є оптимізація системи епідеміологічного нагляду за ЕВІ, а також розробка вітчизняних тест-систем з метою проведення обстеження кожного випадку захворювання при підозрі на ЕВІ та моніторингу навколишнього середовища за допомогою сучасних методів.

М а т е р і а л т а м е т о д и

Усього було проаналізовано 5244 проб біологічного матеріалу. З них із діагнозом серозний менингіт (С. менингіт) - 288 осіб, гостра кишковна інфекція (ГКІ) - 1243, гостра респіраторна вірусна інфекція (ГРВІ) - 3713. Було обстежено 1274 осіб з підозрою на ЕВІ. При дослідженні класичним вірусологічним методом за період 1997-2007 рр. було виділено 163 ЕВ. Нами спільно з вірусологічною лабораторією Донецької облСЕС було досліджено культуральним методом та методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) 3094 проби різноманітної води, з них стічної - 1277, води відкритих водоймів - 910, питної води - 907 проб. Було обстежено понад 20 осередків ЕВІ, в яких було взято 902 проби, з них предмети побуту - 321 проба, предмети особистої гігієни - 211, залишки їжі - 117, від людей, які спілкувалися з хворими, - 253. 450 людей були обстежені методом ІФА з метою визначення титру антитіл до ЕВ.

Статистична обробка даних (тенденції, коефіцієнти кореляції, критерії відповідності Пірсона, показники рангової кореляції Спірмена) виконана з використанням програм Microsoft Excel і STATISTICA. Кореляційний аналіз: метод лінійної кореляції та показник рангової кореляції, визначення статистичної помилки (Sp) для частинки p. Репрезентативність: з урахуванням величини t-критерію при рівнях значення $p \leq 0,05$, $p \leq 0,02$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$. Використано також метод найменших квадратів П.Л. Чебишева з обчисленням рівняння регресії.

Результати та обговорення

Для отримання більш повних статистичних даних про захворюваність на ЕВІ необхідно в статистичну звітність ввести окрему групу - ЕВІ, куди повинні входити захворювання, викликані ЕВ з різними клінічними формами перебігу (ГРВІ, ГКІ, С. менингіти та інші нейроінфекції). Крім того, повинна обов'язково проводитись розшифровка етіології захворювань лабораторними методами [2].

Нами був випробуваний і застосований на практиці комплекс специфічного праймеру до ДНК 207 п.н. (5'-нетрансльованої) області геному ЕВ для всіх типів ЕВ (окрім вірусу поліомієліту) в ПЛР.

При порівнянні з класичним вірусологічним методом даний метод зарекомендував себе як високочутливий при обстеженні хворих: збіг позитивних результатів ми спостерігали в $97,5 \pm 1,22\%$, відсоток збігів при обстеженні об'єктів зовнішнього середовища склав в середньому $80,2 \pm 9,1\%$ [3].

Усі отримані результати є достовірними ($P \leq 0,05$), що характеризує дану методику як точну, і вона може бути використана у вітчизняних лабораторіях.

Нами проводилося обстеження хворих (дорослих і дітей) із різними захворюваннями вірусної етіології при підозрі на ЕВІ методом ПЛР і паралельно - класичним вірусологічним методом.

Отримані результати дозволяли лікарям в більш короткі терміни підтвердити або відкинути діагноз ЕВІ. При порівняльному аналізі результатів, отриманих при проведенні вірусологічного дослідження, та ПЛР відсоток збігів складав від $97,5 \pm 1,22\%$ (включаючи дослідження ліквору) до $79,2 \pm 2,26\%$ і $23,3 \pm 2,4$ (включаючи дослідження калу) в залежності від первинного діагнозу.

Проведення обстежень домашніх осередків дозволило нам виявити інфікованих, які спілкувалися з хворими. Ці особи були класифіковані

Таблиця 1. Визначення ЕВ у матеріалах від хворих за допомогою ПЛР і культуральним методом

Групи обстежених	Метод діагностики						P
	Культуральний			ПЛР			
	N	з них		N	з них		
N		% (M±m)	N		% (M±m)		
С.Менінгіт	48	7	14,6±5,1	48	38	79,2±5,9	0,001
ЕВІ	122	10	8,2±2,5	305	71	23,3±2,4	0,001

або як заразносії, або як хворі легкою, стертою, або атиповою формами. Отримання позитивних результатів при обстеженні предметів ужитку і залишків їжі дозволило нам підтвердити фактори і механізми передачі. Зареєстрований високий відсоток виявлень ЕВ до 98,2±0,74% дозволяє нам рекомендувати метод ПЛР з метою проведення в домашніх осередках лабораторних обстежень за епідеміологічними показниками.

Аналізуючи отримані результати, необхідно зазначити, що метод ПЛР може бути використаний також для моніторингу ЕВІ у зовнішньому середовищі. Оскільки порівнюючи отримані ре-

Таблиця 2. Відсоток осіб із діагностичним рівнем специфічних антитіл до ЕВ Коксакі та ЕСНО серед дітей і дорослих різних вікових груп

Вік, роки	N	Уся група	Неорганізовані	Організовані	P
0-1	50	2,8±6,3			
1-2	50	34,0±6,7			
2-3	50	40,0±6,9	20,0±8,9	53,3±9,1	0,038
3-4	50	48,0±7,1	25,0±9,7	63,3±8,8	0,019
4-5	50	46,0±7,0	25,0±9,7	60,0±8,9	0,033
5-6	50	54,0±7,0	30,0±10,2	70,0±8,4	0,014
6-7	50	64,0±6,8	45,0±11,1	76,7±7,7	0,052
7-8	50	68,0±6,6			
8-9	50	66,0±6,7			
21-40	50	68,0±6,6			
41-60	50	74,0±6,2			
Більше 60	50	60,0±6,9			

зультати обстеження методом ПЛР і класичним методом питної води, води відкритих водойомів і стічної води за 10 років з кривими захворюваності, ми отримали показники статистично достовірної періодичності захворюваності та виявлення ЕВ у воді, які корелювали між собою. Більш того, отримані результати забруднення ЕВ об'єктів зовнішнього середовища можуть бути використані для прогнозування підйому захворюваності на ЕВІ. У наших дослідженнях як у роки підйомів, так і в роки спадів,

найбільша концентрація ЕВ в питній воді реєструвалася за місяць до підйому захворюваності.

Встановлено прямий сильний кореляційний зв'язок між підйомом захворюваності на ЕВІ та знаходженням ЕВ у водах відкритих водойомів і стічних водах, що може бути використано для оцінки активності епідемічного процесу ЕВІ в даному населеному пункті.

Метод ПЛР може бути використаний як для діагностики, так і для моніторингу ЕВІ, оскільки порівняно з іншими методами має ряд загально-відомо переваг.

Авторами Прилуцьким О. С., Бабенко С. В. була розроблена тест-система (державний номер ТУ У 24.6-30206555-002:2007) для визначення антитіл класу G до ентеровірусів Коксакі та ЕСНО в сироватці крові людини методом твердофазного імуоферментного аналізу (авторське свідоцтво № 40595, від 27.04.2009. Бюлетень № 8 від 04.2009).

Результати проведення серомоніторингу серед дитячого та дорослого населення (табл. 2) вказують, що частота серопозитивних на ЕВ осіб залежить як від віку, так і від перебування дітей в організованих колективах. Отримані дані свідчать про те, що велика частина обстежених осіб інфікуються ЕВ в дитячому віці. Так, якщо серопозитивність дітей до 1 року складала 2,8 ± 6,3%, то вже у віці 7 років питома вага осіб з позитивними тестами на специфічні антитіла класу G до ЕВ досягала 68,0±6,6% (P ≤ 0,001). Максимальна ж кількість антитіл до ЕВ була відзначена у віці 41-60 років (74,0±6,2%). Причому, слід зазначити вплив тісноти спілкування дітей на вищевказані показники. Так, серед «організованих» дітей у віці від 2 до 5-ти років відсоток серопозитивних був значно вище (P=0,014-P=0,038), ніж серед обстежених аналогічних вікових груп, які не відвідують організовані колективи. Ефективність розробленої тест-системи, згідно з імунологічними канонами, підтверджена найбільшою концентрацією Ig G i, в середньому, припадає на третій тиждень захворювання, що підтверджено нашими контрольними дослідженнями (табл. 3).

Таблиця 3. Динаміка виявлення IgG до ЕВ Коксакі та ЕСНО методом ІФА при моніторингу за ЕВІ

Предмет	Кількість проб	Відсоток виявлення у залежності від терміну захворювання			Разом,%
		1	2	більше 3	
		тиждень, %	тиждень, %	тижнів, %	
Хворі з різними діагнозами	130	13,3±4,2	26,1±3,3	39,4±3,16	79,8 ±3,14

Результати свідчать про чутливість тест-системи і можливості її використання з метою встановлення стадії захворювання, а також - персистенції вірусів при формуванні носійства (табл. 3). Для епідеміологів розроблена тест-система являє інтерес при встановленні джерел інфекції у розшифровці великих спалахів або епідемій, а також наявності легких і стертих форм захворювання. Найбільш ефективним є комбіноване використання методу ПЛР із визначенням IgG до антигенів вірусів Коксакі та ЕСНО при підозрі на ЕВІ з метою її діагностики.

Це дозволить, проводити моніторинг як дорослих, так і дітей в організованих колективах та визначати групи ризику. Слід зазначити, що необхідно також проводити визначення серотипів вірусів, виділених за допомогою культурального методу або виявлених специфічними праймерами. Визначення серотипу вірусу також повинно робити паралельно із забором крові чи секрету (ліквору) при наявності клінічної картини менінгіту або інших типових проявів ЕВІ.

Таким чином, була визначена етіологічна структура збудників С. менінгіту у м. Донецьку. Вірус Коксакі В був ізольований у 75,7%, а на інші ЕВ припадало 16,2%.

На основі використання та застосування на практиці комплексу специфічного праймеру до ДНК 207 (5'-нетрансльованої) області геному ЕВ для всіх типів ЕВ (окрім вірусу поліомієліту) в ПЛР отримані позитивні результати при обстеженні предметів ужитку (98,2 ± 0,74%) та залишків їжі (82,6 ± 3,50%) в осередках ЕВІ. Зареєстрований високий відсоток збігів - в середньому 93,1 ± 3,65% (P 0,024) між ПЛР і класичним культуральним методом при спостереженні за тими, хто спілкувався з хворими на ЕВІ, це дозволяє рекомендувати метод ПЛР для проведення епідеміологічного обстеження у домашніх осередках. Створена і використана на практиці тест - система для ІФА для визначення рівнів Ig G до ЕВ Коксакі та ЕСНО у хворих на ЕВІ, яка дозволяє протягом 2,5 годин виявляти рівні специфічних антитіл (79,8 ± 3,14% позитивних результатів). Метод має високу специфічність і не залежить від прищепного анамнезу обстежених дітей. Запропоновано схему діагностики на

ЕВІ у хворих з підозрою на ентеровірусну етіологію захворювання з використанням методів ПЛР та ІФА, що дозволило удосконалити епідагляд за цими інфекціями, а застосування розроблених формул для короткострокового та довгострокового прогнозування захворюваності на С. менінгіт дозволяє своєчасно планувати протиепідемічні заходи у необхідному обсязі.

A.S. Prilutskiy, A.G. Kolesnikova, S.V. Babenko

Methodical approaches to the molecular-genetic diagnostics EVI- enteroviral infections

In this paper a comparative assessment of the specificity and sensitivity of the PCR test system in comparison with culture method was demonstrated. The author presents IFA test system which allows to define IgG to EV Koksaki and ECHO (University clinic. — 2013. — Vol.9, №2. — P. 252-254).

Keywords: enteroviral infections, enteroviruses, morbidity, detection, polymerase chain reaction, immunoglobulin G, epidemiological surveillance.

А.С. Прилуцький, А.Г. Колесникова, С.В. Бабенко

Методические подходы к молекулярно-генетической диагностике энтеровирусной инфекции

Проведена сравнительная оценка специфичности и чувствительности тест-системы полимеразной цепной реакции, со специфическим праймером к ДНК 207 п.н. (5'-нетранслируемой) области генома энтеровирусов для всех типов энтеровирусов (кроме вируса полиомиелита) в сравнении с классическим культуральным методом. Предложен методологический подход совместного использования тест-системы полимеразной цепной реакции и иммуноферментных реакции с определением антител класса G к вирусам Коксаки и ЕСНО (Университетская клиника. — 2013. — Т.9, №2. — С. 252-254)

Ключевые слова: энтеровирусные инфекции, энтеровирусы, заболеваемость, полимеразная цепная реакция, иммуноглобулины G, эпидемиологический надзор.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доан С. І. Энтеровірусні інфекції (епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика). - Київ, 2010.- С. 208.
2. Колесникова А.Г., Бабенко С.В., Микрюкова Н.Г. и др. Удельный вес водного фактора в распространении серозного менингита в донецком регионе // Университетская клиника.-2008.- Том 4, №1.-С. 100-106.
3. Колесникова А.Г., Прилуцкий А.С., Бабенко С. В. и др. Эпидемические особенности распространения энтеровирусных инфекций в промышленном регионе // Университетская клиника.-2008.- Т. 4, №1.-С. 95-99.

Надійшла до редакції: 7.04.2013