

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2013

І.Ф. Самборська¹, І.Г. Костенко², Г.Г. Ковалишин¹,
О.Б. Надрага³, Г.О. Литвин³, І.В. Дзюблик¹,
С.О. Соловйов¹, С.Г. Вороненко¹

НОРОВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ ЗА ДАНИМИ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА КЛІНІЧНИХ СПОСТЕРЕЖЕНЬ

¹Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика МОЗ України,

²Головний військово-медичний клінічний центр «ГВКГ»
МО України,

³Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького

Вступ. Норовіруси (НВ) людини претендують на лідерські позиції серед збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ) вірусної природи. Найбільшу небезпеку ці інфекції представляють для дітей перших років життя, бо мають високі показники захворюваності і летальності.

Мета. Визначення маркерів норовірусної інфекції (НВІ) та дослідження особливостей клінічного перебігу захворювань, спричинених НВ, у дітей раннього віку.

Матеріали і методи. Для визначення маркерів НВІ у фекальних пробах від дітей, що знаходилися на стаціонарному лікуванні, застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) та імуноферментний аналіз (ІФА). Важкість перебігу захворювання оцінено за шкалою Весікарі.

Результати. У дітей раннього віку, хворих на ГКІ, було виявлено фрагменти геному НВ у 48,45 % і антигени НВ – у 32,99 %. До найбільш уразливої до НВ вікової групи увійшли діти, старші за 6 місяців. У 68,2 % пацієнтів при госпіталізації спостерігалось поєднання трьох симптомів: блювоти, діареї, гіпертермії.

Висновки. Метод ЗТ-ПЛР охарактеризовано як більш чутливий і пріоритетний для лабораторної діагностики НВІ порівняно з ІФА. У більшості хворих наявна триада основних симптомів: блювота, діарея, лихоманка, а перебіг захворювання оцінено як середньо важкий.

Ключові слова: норовірусна інфекція, норовіруси, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, діти раннього віку.

ВСТУП

ГКІ залишаються однією з найважливіших медичних проблем в інфекційній патології дітей як у економічно розвинених країнах, так і в країнах, що розвиваються. За частотою та поширеністю їх можна порівняти хіба що з гострими респіраторними захворюваннями. Найбільшу небезпеку ГКІ представляють для дітей перших років життя, бо мають високі показники захворюваності й летальності [1, 2, 3]. Щорічно у світі від них гине 2,5 - 3,2 млн. дітей віком до 5 років. У країнах з низьким і середнім рівнем економічного розвитку число дітей, що хворіють на ГКІ сягає 2 мільярдів на рік [2].

На часі поряд із широким застосуванням в лабораторній діагностиці ГКІ імуноферментного аналізу стрімко впроваджуються молекулярно-генетичні методи дослідження, результати яких суттєво змінюють наше уявлення про роль вірусів у розвитку

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту. Безсумнівним є той факт, що провідну роль в спричиненні ГКІ у дітей відіграють віруси [1, 3]. Серед етіологічних агентів гострих гастроентеритів (ГЕ) найбільше значення мають ротавіруси, норовіруси, кишкові аденовіруси, астровіруси, ентеральні коронавіруси [1, 3].

Важливо підкреслити, що норовіруси (НВ) людини нині конкурують із ротавірусами за лідерські позиції серед збудників ГКІ при масових захворюваннях дітей [1, 3]. Вони спричинюють до 90 % спалахів гострих ГЕ вірусної природи в різних країнах світу [3, 4]. Так, в Японії в 1995 р. епідемію НВІ було охоплено 5 мільйонів дітей. В Європі впродовж 2001 – 2006 рр. було зафіксовано 7636 спалахів гострих ГЕ норовірусної етіології [4]. Більшість таких спалахів реєструють серед дітей дошкільного та шкільного віку у дитячих садках, школах, інтернатах, лікувальних установах, санаторіях, таборах відпочинку та інших закладах, де діти перебувають в умовах обмеженого простору [3, 4, 5].

Значно зріс внесок норовірусних ГЕ у спорадичну захворюваність. Так, у США реєструється близько 23 мільйонів випадків захворювань на НВІ на рік. Щорічно ці віруси є причиною 900 000 відвідувань клінік з приводу ГКІ у дітей у розвинених країнах і до 200 000 летальних випадків серед дітей віком до 5 років у країнах, що розвиваються [6]. Серологічні дослідження, проведені в Канаді, Бразилії, Мексиці, Чилі, південній Африці та інших країнах, показали, що більшість дітей перенесли перше захворювання на НВІ до 5-річного віку [5, 7]. За даними досліджень, проведених на територіях різних країн, частота виявлення НВ у дітей, госпіталізованих з гострими ГЕ, коливається від 6 до 48%, при середньому рівні – 12-14 % [5, 6, 7].

В Росії відсоток НВІ в структурі ГКІ в різні місяці 2005 – 2011 рр. складав до 15,3 % у Ставрополі, до 16,8 % - у Москві, до 17,3 % - у Новосибірську, до 18,8 % - в стаціонарах Нижнього Новгороду, до 27,1 % - в Архангельську, до – 44 % у Санкт – Петербурзі [3, 8]. Оцінка значних масштабів розповсюдження НВ і пов'язаного з ними високого рівня захворюваності прискорили впровадження обов'язкової лабораторної діагностики НВІ із застосуванням молекулярних методів на території Росії з 2011 р.

У Казахстані етіологічна роль НВ у розвитку ГКІ лабораторно підтверджується в 13,8 % – 17,9% спорадичних випадків захворювання, у Білорусі – в 29 % [9, 10]. Все це дає підстави говорити про друге місце НВ (після ротавірусів) в етіологічній структурі спорадичної захворюваності на ГКІ у дітей [3].

Перші наукові дослідження щодо вивчення поширення НВ в Україні, можливостей впровадження та ефективності застосування експресних методів лабораторної діагностики НВІ, особливостей клінічного перебігу захворювання у дітей різних вікових груп були розпочаті на кафедрі вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика.

Мета роботи: визначити маркери НВІ та дослідити особливості клінічного перебігу ГКІ, спричинених норовірусами, у дітей раннього віку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Лабораторним обстеженням та клінічним спостереженням обстежено 97 дітей перших трьох років життя, які знаходилися на лікуванні у педіатричному відділенні Комунальної інфекційної клінічної лікарні м. Львова з діагнозом ГКІ та гострий ГЕ. Для лабораторної діагностики захворювання проводився збір нативних фекалій протягом першої доби перебування у стаціонарі. Готувалися 50% суспензії фекалій на фосфатно-сольовому буферному розчині в стерильних пластикових пробірках, заморожувалися, зберігалися при температурі -20° С та транспортувалися в лабораторію з дотриманням вимог щодо збереження холодового ланцюга.

Дослідження з метою визначення маркерів НВІ (антигенів і геномної РНК) проводили на лабораторній базі кафедри вірусології НМАПО імені П. Л. Шупика. Визначення антигенів (АГ) НВ здійснювали методом ІФА у прямому варіанті (за принципом «сендвіч» - методу) з підсиленням системою біотин – стрептавидин. Застосовували тест-систему «RIDAS-CREEN® Norovirus-3rd Generation» (Німеччина), яка виконана у форматі 96-ти луночного мікропланшети і дає можливість одночасного визначення антигенів НВ I та II генотипів у кожній пробі. Чутливість її – 83% по відношенню до RT-PCR, специфічність – 100%. Промивали планшети за допомогою вошера Wellwash 4 МК 2 Thermo Elektron Corporation. Для обліку результатів реакції застосовували спектрофотометр Multiskan Ascent Thermo Labsystems (Фінляндія) у двохвильовому режимі 450/ 620nm.

Виявлення фрагментів геномної РНК НВ здійснювали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Використовували тест-систему «АмплиСенс® Norovirus 1, 2 genotypes» (Росія) з електрофоретичною детекцією, яка дає можливість одночасного виявлення та диференціювання фрагментів РНК НВ I та II генотипів у фекальних суспензіях. Аналітична чутливість її – 103 ге/мл, специфічність – 100%. До складу тест-системи увійшли чотири комплекти реагентів: комплект №1 – для виділення РНК з клінічного матеріалу; комплект №2 – для отримання кДНК на матриці РНК; комплект №3 – для ампліфікації ділянки кДНК; комплект №4 – для електрофоретичного аналізу ампліфікованої кДНК. Ампліфікацію проводили в термоциклері MyCycler (BioRad, США), детекцію – в 2% агарозному гелі з наступним відеогельдокументуванням на обладнанні BioRad (США).

Паралельно всі діти були охоплені загальними клінічними та бактеріологічними обстеженнями.

Важкість перебігу гострого ГЕ оцінювали за 0-20 бальною шкалою Весікарі (Vesikari). Відповідно до рекомендацій Russaka T. оцінка за шкалою в 7 і менше балів характеризувала неважкий ступінь перебігу захворювання, 8-10 балів – помірно важкий, 11 – 13 балів – важкий, 14 і вище – дуже важкий. Статистичний аналіз даних проводився з використанням програми Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено лабораторне обстеження 97 дітей з діагнозом ГКІ. Середній вік пацієнтів всієї групи становив $18,7 \pm 1,35$ місяців. Співвідношення хлопчиків і дівчаток рівнялося 1:1.

Клінічний матеріал від хворих досліджували паралельно двома методами: ЗТ – ПЛР та ІФА. За результатами ЗТ-ПЛР у 47 пробах, а відповідно в 48,45 % випадків були виявлені фрагменти РНК НВ. При використанні ІФА антигени НВ були визначені в 32 пробах, а відповідно в 32,99 % випадків. Більш високі показники позитивних результатів, отриманих за допомогою ЗТ-ПЛР порівняно з ІФА, пояснюються надзвичайно високою аналітичною чутливістю молекулярно-генетичного методу. Серед переваг його застосування треба зазначити також високу специфічність, можливість диференційної діагностики збудників за генотипами, відтворюваність результатів, швидкість виконання, автоматизацію етапів проведення реакції та обліку результатів, можливість їх відеодокументування тощо. Фахівці, які досліджують можливості визначення етіологічних агентів ГКІ людини, вважають ЗТ-ПЛР аналіз «золотим стандартом» в лабораторній діагностиці НВІ.

Всі діти, інфіковані НВ, були госпіталізовані на $3,10 \pm 0,38$ добу від появи перших симптомів захворювання.

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

При розподілі хворих за віком до найбільш уразливої до НВІ групи увійшли діти, старші за 6 місяців. Вони склали переважну більшість серед усіх хворих на НВІ, а саме - 93,2 %, серед яких 60 % були у віковому діапазоні від 6 до 18 місяців.

Для вивчення особливостей клінічного перебігу НВІ сформована група з 23 дітей, в яких етіологічний діагноз підтверджений результатами обох методів лабораторної діагностики. У 68,2 % пацієнтів з НВІ при госпіталізації спостерігалось поєднання трьох основних симптомів: блювоти, діареї, гіпертермії. У решти діагностовано поєднання 2-х з них: діареї і гіпертермії або діареї і блювоти.

Частота розвитку основних симптомів у пацієнтів, хворих на НВІ, згідно з оцінкою за шкалою Весікарі надана в таблиці 1.

Таблиця 1

Основні симптоми НВІ у дітей перших років життя
згідно з оцінкою за шкалою Весікарі

Клінічні прояви НВІ	Абсолютне значення	Відсоток (%)
Тривалість діареї (дні)		
< 1 день (0 балів)	2	8,7 %
1 – 4 (1 бал)	10	43,5 %
5 (2 бали)	5	21,7 %
> 5 (3 бали)	6	26,1 %
Найбільша кількість випорожнень за 24 год		
1-3 (1 бал)	7	30,4 %
4-5 (2 бали)	8	34,8 %
> 5 (3 бали)	8	34,8 %
Тривалість блювоти (дні)		
Відсутня (0 балів)	2	8,7 %
1 (1 бал)	7	34,8 %
2 (2 бали)	5	21,7 %
> 2 (3 бали)	9	39,1 %
Найбільша кількість епізодів блювоти за 24 год		
Відсутня (0 балів)	2	8,7 %
1 (1 бал)	1	4,3 %
2 – 4 (2 бали)	10	43,5 %
> 4 (3 бали)	10	43,5 %
Гіпертермія		
< 37,1 (0 балів)	7	30,4 %
37,1-38,4 (1 бал)	8	34,8 %
38,5-38,9 (2 бали)	6	26,1 %
>38,9 (3 бали)	2	8,7 %
Дегідратація		
Відсутня (0 балів)	10	43,5 %
1% - 5% (2 бали)	4	17,4 %
> 5% (3 бали)	9	39,1 %
Лікування		
Не проводилося (0 балів)	0	0,0 %
Регідратація (1 бал)	9	39,1 %
Госпіталізація (3 бали)	14	60,9 %

Тяжкість клінічних проявів ГЕ, спричиненого НВ, за шкалою Весікарі була оцінена в середньому в $10,8 \pm 0,45$ балів. Тяжкий перебіг захворювання спостерігався у 2 дітей (8,7%). У більшості ж хворих, а саме у 19 осіб (82,6%) він був охарактеризований як середньо тяжкий. Важкий стан тривав впродовж $4,6 \pm 0,4$ днів ($p < 0,05$). Виразне покращення було зафіксовано на $6,3 \pm 0,39$ добу. Визначена лікарем важкість стану, як суб'єктивна оцінка, перебувала в позитивному кореляційному зв'язку з важкістю стану дитини, вираженою в балах за шкалою Весікарі ($r=0,49$, $p < 0,05$).

У всіх 23 дітей (100,0%) з підтвердженою НВІ мала місце діарея, яка у 11 осіб (47,8%) тривала 5 днів і довше. У 16 хворих (69,6%) кількість випорожнень дорівнювалася 4-5 і більше разів на добу, а у 7 дітей (30,4%) важка діарея проявилася понад 10-ма епізодами на день.

Перебіг НВІ характеризувався наявністю блювоти у переважної більшості пацієнтів: у 21 (91,3%), серед яких шестеро (26,1%) страждали на важку блювоту - понад 10 епізодів на день.

Гіпертермія (температура вища за $37,1^\circ\text{C}$) спостерігалася у всіх 23 дітей (100,0%). У 8 з них (34,8%) температура сягала $38,5^\circ\text{C}$ і вище, у 2 хворих (8,7%) перевищувала $38,9^\circ\text{C}$.

Окрім ГЕ у 13 дітей з НВІ (56,5%) при госпіталізації відмічалася клінічна картина ураження верхніх дихальних шляхів – гострий риніт, фарингіт, трахеїт, тонзиліт. Ці симптоми виникали за 1 - 2 дні до маніфестації гастроентериту і у більшості дітей передували гіпертермії. Вони зникали після підвищення температури і більш не спостерігалися.

В нашому дослідженні моно інфекція НВ підтверджена у 56,7% пацієнтів. У 7 хворих виявлені одночасно маркери НВ і ротавірусів, у 4-х – НВ і астровірусів. Вираженість основних симптомів у хворих статистично достовірно не відрізнялась при моно- і мікст-інфекціях.

Ця робота разом з чисельними дослідженнями, проведеними в багатьох країнах світу, доводить, що значення НВІ серед кишкових захворювань у дітей величезне, проте ще недостатньо оцінено, тож потребує подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

- За результатами лабораторної діагностики у дітей раннього віку з діагнозом ГКІ в 48,45% випадків були виявлені фрагменти РНК норовірусів методом ЗТ-ПЛР і в 32,99% випадків були визначені антигени НВ методом ІФА.
- Метод ЗТ-ПЛР характеризується більш високими показниками чутливості порівняно з ІФА та є пріоритетним для сучасної лабораторної діагностики НВІ.
- У більшості пацієнтів (68,2%) з НВІ при госпіталізації спостерігалася поєднання трьох основних симптомів: блювоти, діареї, лихоманки.
- Перебіг захворювання був оцінений як середньо важкий у переважної більшості дітей (82,6%).

Література

1. Thorngprachum A., Khamrin P., Chan-It W. et al. Emergence of Norovirus GII/4 2006a and 2006b Variants in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Thailand. *Clinical Lab.* 2013; 59.
2. Wardlaw T., Salama P., Brocklehurst C. et al. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet.* 2010, 375 (9718): 870–872.
3. Боднев С. А., Малеев В. В., Жираковская Е. В. и др. Норовирусы как этиологический фактор острых кишечных инфекций у детей раннего возраста в Новосибирске. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2010, 1: 40–44.

4. Kroneman AVerhoef, L., Harris J. et al. Analysis of Integrated Virological and Epidemiological Reports of Norovirus Outbreaks Collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46 (9): 2959-2965.
5. Bull R., Tu E., McIver C. et al. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 327 – 333.
6. Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I. et al. Systematic literature review of role of human noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14 (8): 1224 – 1231.
7. Nakagomi T., Correia J.B., Nakagomi O. et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch. Virol.* 2008, 153 (5): 957 – 960.
8. Каджаева Э. П., Горелов А.В., Усенко Д.В. и др. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в крупный стационар Москвы. *Инфекционные болезни.* 2006, 4 (2): 34-36.
9. Куатбаева А., Утегенова Э., Жолшоринов А. и др. О роли норовирусной инфекции в структуре острых кишечных инфекций у детей в Казахстане. *Материалы V Ежегодного Всерос. Конгресса по инфекционным болезням, 25-27 марта 2013 . Москва. 2013.*
10. Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Игнатьев Г.М. Генетический анализ норовирусов – возбудителей острых гастроэнтеритов в Минске в 2009 – 2010 гг. *Молекулярная диагностика 2010. Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва. 2010, II: 381-383.*

И.Ф. Самборская, И.Г. Костенко, Г.Г. Ковалишин,
А.Б. Надрага, Г.О. Литвин, И.В. Дзюблик,
С.А. Соловьев, С.Г. Вороненко

Норовирусная инфекция у детей раннего возраста по данным вирусологических исследований и клинических наблюдений

Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л. Шупика МЗ Украины,

Главный военно-медицинский клинический центр «ГВКГ»
МО Украины,

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого

Введение. Норовирусы человека претендуют на лидерские позиции среди возбудителей ОКИ вирусной природы. Наибольшую опасность эти инфекции представляют для детей первых лет жизни, поскольку имеют высокие показатели заболеваемости и смертности. Цель. Определение маркеров НВИ и исследование особенностей клинического течения заболеваний, вызванных НВ, у детей раннего возраста.

Материалы и методы. Для определения маркеров НВИ в фекальных пробах от детей, находившихся на стационарном лечении, были применены метод ОТ-ПЦР и ИФА. Тяжесть течения болезни оценивалась по шкале Весикари.

Результаты. У детей раннего возраста с диагнозом ОКИ были обнаружены фрагменты генома НВ у 48,45 % и антигены НВ – у 32,99%. В наиболее уязвимую к НВ возрастную группу вошли дети старше 6 месяцев. У 68,2 % пациентов при госпитализации наблюдалось сочетание трех симптомов: рвоты, диареи, гипертермии.

Выводы. Метод ОТ-ПЦР охарактеризован как более чувствительный и приоритетный для лабораторной диагностики НВИ в сравнении с ИФА. У большинства больных присутствует триада основных симптомов: рвота, диарея, лихорадка, а течение заболевания оценено как средне тяжелое.

Ключевые слова: норовирусная инфекция, норовирусы, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, дети раннего возраста.

I. F. Sambors'ka, I. H. Kostenko, H. H. Kovalyshyn,
O. B. Nadraha, H. O. Lytvyn, I. V. Dziublyk,
S. O. Soloviov, S. H. Voronenko

Norovirus Infection in Young Children According to Virology and Clinical Research Data

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education
of the Ministry of Health of Ukraine,
Main Military Medical Clinical Centre of the Ministry
of Defense of Ukraine

³Danylo Halyts'kyi L'viv National Medical University

Introduction. Human noroviruses (NoV) are in the lead among the agents causing viral acute enteric infections (AEI). These infections are most dangerous for infants and young children as they have high rates of morbidity and mortality.

Aim. To determine the markers of norovirus infection (NoVI) and to study the peculiarities of clinical course of the diseases, caused by NoV in young children.

Materials and methods. To determine the markers of NoVI in fecal samples of children, who underwent in-patient treatment, there was used the method of reverse transcription polymerase chain reaction and ELISA. The severity of the disease was estimated with the use of Vesikari scale. Results. There were discovered the fragments of NoV genome in 48.45 % and NoV antigens – in 32.99 % of young children with acute enteric infection. The age group most vulnerable to NoV included children over 6 months. 68.2 % of the hospitalized patients demonstrated the combination of three symptoms: vomiting, diarrhea and hyperthermia.

Conclusion. The method of reverse transcription polymerase chain reaction is characterized as the most sensitive and priority for the laboratory diagnostics of NoVI compared to ELISA. Most patients had the triad of main symptoms: vomiting, diarrhea, fever, and the course of the disease was estimated as medium severe.

Key words: norovirus infection, noroviruses, polymerase chain reaction, ELISA, young children.