

УДК: 616.988:616.2:616.34]-036.22(477):578.858]-076/.078

МУЛЬТИПЛЕКСНА ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ В ДІАГНОСТИЦІ ГРВІ У ГОСПІТАЛІЗОВАНИХ ДІТЕЙ З БРОНХООБСТРУКТИВНИМ СИНДРОМОМ

Бойко Ю. О.

Руденко С. М.

Дзюблик І. В., доктор медичних наук, професор

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України
(Київ, Україна)

Резюме: Метою нашого дослідження стало застосування методу мультиплексної ПЛР в етіологічній діагностиці ГРВІ у госпіталізованих дітей з бронхообструктивним синдромом. Обстежено 28 дітей у віці від 5 місяців до 6 років. Середній вік пацієнтів становив 33,7 (95% СІ 24,5 - 43,0) місяців. Віруси були ідентифіковані у 75% хворих. У 39,3% було виявлено бокавірус 1 типу. Загострення бронхіальної астми у 2,3 рази частіше асоціювалося з бокавірусною інфекцією порівняно з хворими на обструктивний бронхіт (RR=2,3 (95% СІ 0,9-6,2)). Тривалість бронхообструктивного синдрому у дітей з бронхіальною астмою була достовірно більшою (p<0,0001) ніж у дітей з обструктивним бронхітом - 5,3 (95% СІ 4,1-6,4) дні проти 2,7 (95% СІ 2,3-3,1) днів. Результати дослідження підтверджують етіологічну роль бокавірусної інфекції у виникненні бронхообструктивного синдрому у дітей молодшого віку, що проживають в Україні.

Ключові слова: ПЛР, мультиплексна ПЛР в режимі реального часу, діти молодшого віку, ГРВІ, бронхообструктивний синдром.

Резюме: Целью нашего исследования стало применение метода мультиплексной ПЦР в этиологической диагностике ОРВИ у госпитализированных детей с бронхообструктивным синдромом. Обследовано 28 детей в возрасте от 5 месяцев до 6 лет. Средний возраст пациентов составил 33,7 (95% СИ 24,5 - 43,0) месяцев. Вирусы были идентифицированы у 75% больных. У 39,3% было выявлено бокавирус 1 типа. Обострение бронхиальной астмы 2,3 раза чаще ассоциируется с бокавирусной инфекцией сравнительно с больными на обструктивный бронхит (RR=2,3 (95% СИ 0,9-6,2)). Длительность бронхообструктивного синдрома у детей с бронхиальной астмой была значительно выше (p<0,0001) нежели у детей с обструктивным бронхитом 5,3 (95% СИ 4,1-6,4) дня против 2,7 (95% СИ 2,3-3,1) дня. Результаты исследований подтверждают этиологическую роль бокавирусной инфекции у возникновении бронхообструктивного синдрома у детей младшего возраста, которые проживают на территории Украины.

Ключевые слова: ПЦР, мультиплексная ПЦР в режиме реального времени, дети младшего возраста, ОРВИ, бронхообструктивный синдром.

Summary: The aim of our research was the use of multiplex Polymerase chain reaction (PCR) method in etiological diagnosis of Upper respiratory tract infections (URTI) in hospitalized children with a bronchial syndrome. The research involved 28 children aged 5 months to 6 years. The mean age of patients was 33,7 (95% CI 24,5 – 43,0) months. Viruses were identified at 75% of patients. At 39,3% Bokaivirus was found. Metapneumovirus was found at 10,7% of patients. Exacerbation of bronchial asthma is 2,3 times more likely to be associated with the Bokaivirus infection in comparison with patients with obstructive bronchitis (RR = 2,3 (95% CI 0,9-6,2)). Duration of the bronchial obstruction syndrome in children with bronchial asthma was significantly higher (p <0,0001) than in children with obstructive bronchitis – 5,3 (95% CI 4,1-6,4) days versus 2,7 (95% CI 2,3-3,1) days. Results of the research confirm the etiologic role of viral infections and new respiratory viruses in the occurrence of the bronchial obstruction syndrome.

Key words: PCR, multiplexed PCR in real time, children, URTI, bronchial obstruction syndrome.

Захворювання органів дихання посідають провідне місце у структурі дитячої патології, при цьому майже 85% серед них займають гострі респіраторні захворювання (ГРЗ). ГРЗ також посідають провідне місце в структурі інфекційної патології у дітей, становлячи 90% усіх дитячих інфекцій [1]. Щорічно у світі реєструється понад 1 млрд. хворих на ГРЗ, збудниками яких переважно являються віруси [1]. Класичними збудниками гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) є віруси грипу А,В,С, парагрипу, респіраторно-синцитіальний вірус, риновіруси та аденовіруси людини. Проте, за останні 8 років були відкриті нові респіраторні віруси, серед яких особливе значення набувають бокавірус, метапневмовірус та коронавіруси SARS, NL63, HKU1 [2]. Вперше бокавірус людини (Human Bocavirus - HBoV) був виявлений та ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) Томасом Алландером та колегами у хворих на пневмонію дітей у 2005 р. в Швеції. Ампліфіковані продукти ПЛР були відокремлені по вектору та сіквензовані. Після оцінювання подібностей в структурі HBoV було встановлено, що виділений вірус є новим представником родини парвовірусів, в яку входять досить поширені у біосфері ДНК-вмісні віруси простої будови [2]. У 2006 р. HBoV був виявлений у дітей Канади з клінічними проявами ГРВІ. Від того часу HBoV стали пов'язувати із захворюваннями верхніх та нижніх дихальних шляхів у дітей. В квітні 2009 р. в Австралії був відкритий третій бокавірус людини - HBoV-3 [3]. Нещодавно, в 2010 р. вперше був ідентифікований HBoV-4 [4]. На часі повідомлення про виявлення HBoV в матеріалах від хворих різних вікових груп на ГРВІ надходять із Франції, Австралії, Японії, Італії, Ізраїлю, Іспанії, Германії, Індії, Ірану та Росії [6]. При цьому, показники захворюваності людей на бокавірусну інфекцію в цих країнах коливаються досить в широких межах, а їх клінічні прояви характеризуються значним розмаїттям. Розширення спектру збудників ГРВІ за рахунок метапневмовірусу та коронавірусів SARS, NL63, HKU1, що були також ідентифіковані молекулярно-генетичними методами, сприяло проведенню великої кількості досліджень щодо визначення етіологічної ролі «нових» збудників ГРВІ у виникненні бронхообструктивного синдрому (БОС) як у дітей, так і у дорослих, проте жодного дослідження в Україні не проводилось.

Мета дослідження: застосувати метод мультиплексної ПЛР в режимі реального часу в етіологічній діагностиці ГРВІ у госпіталізованих дітей з бронхообструктивним синдромом.

Матеріали та методи дослідження. У дослідження було включено 28 дітей віком від 5 місяців до 6 років. Середній вік пацієнтів становив 33,7 (95% СІ 24,5 - 43,0) місяців. З них хлопчиків - 20 (71,4%), дівчаток - 8 (28,6%). З діагнозом БА у дослідження було включено 12 (43%) дітей, з повторними епізодами обструктивного бронхіту (ОБ) - 16 (57%) дітей. Діти обстежувалися та лікувалися в стаціонарі НДСЛ «ОХМАТДИТ» протягом 2012 року.

Верифікація діагнозів та лікування дітей з ОБ та БА проводилися згідно відповідних протоколів. Діагноз БА встановлювався згідно «Протоколу діагностики та лікування бронхіальної астми у дітей» (Наказ № 128 МОЗ України від 19.03.2007), діагноз ОБ встановлювався згідно «Протоколу надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «Дитяча пульмонологія».

У всіх хворих проводили загальноклінічні дослідження, що включали: загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, біохімічний аналіз крові, рівень сироваткового загального IgE.

Для виявлення респіраторних вірусів проводився забір біоматеріалу у вигляді мазку з носової порожнини. Матеріал відбирали у повній відповідності до вимог методичних рекомендацій «Порядок відбору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції».

Мазки з носу відбирали сухим стерильним зондом. Для ПЛР-дослідження після взяття матеріалу робочу частину зонда поміщали в стерильну одноразову мікропробірку з спеціальним транспортним середовищем для запобігання інактивації вірусів. Кінчик зонда відламували або відрізали з розрахунку можливості щільно закрити кришку пробірки. Пробірку з транспортним середовищем та частиною зонду поміщали у холодильну камеру

при $t=15-18^{\circ}\text{C}$. Надалі матеріал для дослідження транспортували у контейнерах з холодоагентом до вірусологічної лабораторії кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України. Виявлення та ідентифікацію респіраторних вірусів здійснювали за допомогою методу мультиплексної ПЛР в реальному часі. Застосовували набір реагентів для виявлення збудників ГРВІ людини: РНК респіраторно-синцитіального вірусу (human Respiratory Syncytial virus - hRSv), метапневмовірусу (human Metapneumovirus - hMpv), вірусів парагрипу 1, 2, 3, 4 типів (human Parainfluenza virus – hPiv 1-4), коронавірусів OC43, E229, NL63, HKU1 (human Coronavirus - hCov), риновірусів (human Rhinovirus - hRv), ДНК аденовірусів групи В, С і Е (human Adenovirus В, С, Е - hAv), бокавірусу І типу (human Bocavirus - hBov) в клінічному матеріалі методом ПЛР з гібридизаційно – флуоресцентною детекцією «АмплиСенс ОРВІ. Скрин - FL» (Російська федерація). Ампліфікацію здійснювали на Rotor G 6000 Corbett Research (Австралія).

Результати та їх обговорення. Найбільш поширеною та популярною молекулярно-генетичною технологією ідентифікації збудників захворювань людини, в тому числі нових респіраторних вірусів, є ПЛР у її різних варіантах. За короткий проміжок часу ПЛР стала основним «діагностичним інструмент третього тисячоліття». Простота у використанні, висока чутливість та специфічність, можливість дослідження будь-якого клінічного матеріалу в мінімальному обсязі, характерні для більшості варіантів ПЛР. Проте, серед варіантів ПЛР нашу увагу привернула мультиплексна ПЛР в режимі реального часу (Multi Real-Time PCR), яка дозволяє одночасне виявлення в одній пробі клінічного матеріалу від 6 до 12 збудників, що дуже важливо для проведення етіологічної діагностики у дітей та у зв'язку з великою кількістю потенціальних збудників ГРВІ [5].

За допомогою мультиплексної ПЛР у реальному часі респіраторні віруси в клінічному матеріалі були ідентифіковані у 21 (75%) дитини з БОС.

Найчастіше у дітей з БОС виявлявся бокавірус І типу (рис. 1).

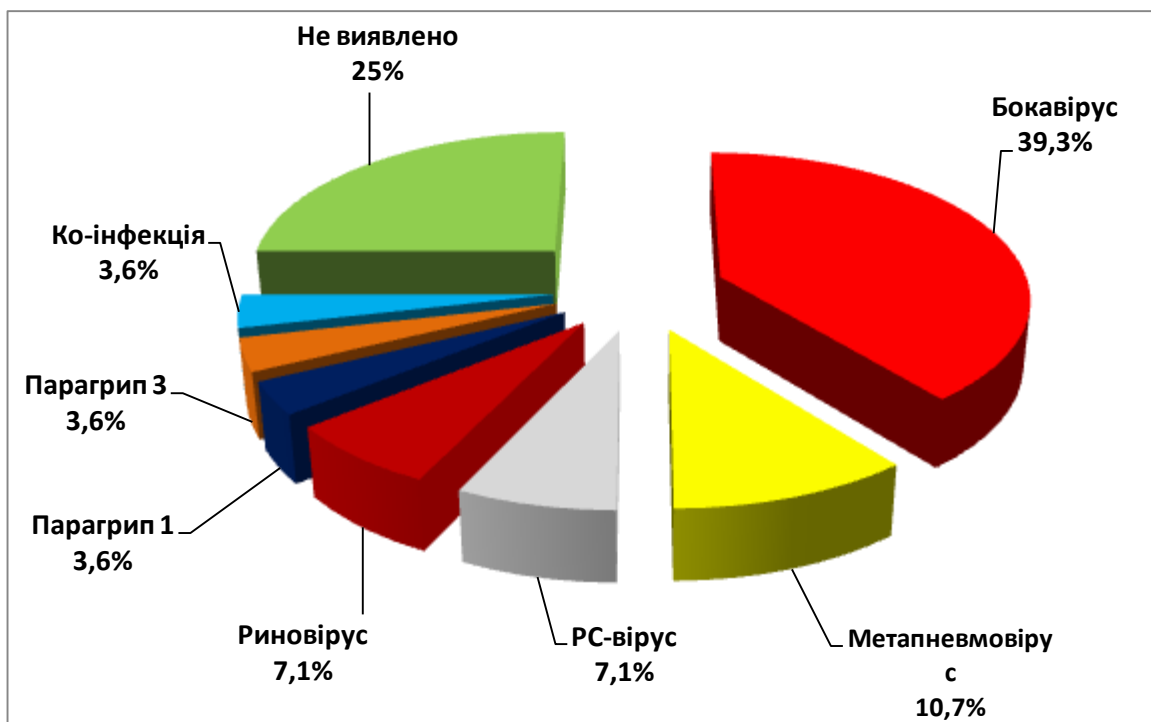


Рис.1. Структура ГРВІ у дітей з ОБ та БА

Другим за частотою ідентифікації був метапневмовірус, який було визначено у 10,7% дітей. Риновірус та РС-вірус були виявлені у 7,1% дітей кожен. У 3,6% випадків ідентифіковано віруси парагрипу 1 і 3 типів, у 3,6% випадків зафіксовано ко-інфекцію (метапневмовірусу і вірусу парагрипу 1 типу).

При розподілі частоти ідентифікації респіраторних вірусів відносно віку було виявлено 80 – 85,7% позитивних проб у дітей віком старше 1 року, тоді як у хворих віком до 1 року кількість позитивних проб на наявність збудників ГРВІ складала 50%, але статистично значущі показники не відрізнялися ($p > 0,05$). Респіраторні віруси ідентифікувалися протягом року. У матеріалі, що відбирався навесні 2012 р., віруси були виявлені у 100% випадків, влітку – у 86%, восени віруси були ідентифіковані у 75% дітей, тоді як зимою лише у 40% випадків. У дітей обох груп ідентифікація вірусів складала 75%. Як у дітей з ОБ, так і у дітей із загостренням БА найчастіше виявлявся бокавірус І типу. У пацієнтів з ОБ бокавірус складав 25% випадків, тоді як у дітей з БА бокавірус виявлявся у 58,4% випадків. Частота виявлення бокавірусів вірогідно значимо не відрізнялась між дітьми з ОБ та БА ($p > 0,05$), але клінічно значущу відмінність все ж було встановлено. Відносний ризик (Relative Risk, RR) $RR=2,3$ (95% CI 0,9-6,2), тобто загострення БА у дітей у 2,3 рази частіше були пов'язані з бокавірусною інфекцією порівняно з хворими на ОБ. Також у дітей із загостренням БА були виявлені метапневмовірус та риновіруси у 8,3% випадків. У дітей з ОБ спектр респіраторних вірусів був значно ширшим. Метапневмовірус, РС-вірус та віруси парагрипу ідентифіковані у 12,5% дітей, риновірус та ко-інфекція були виявлені у 6,25% випадків ОБ. Клінічна картина в обох групах суттєво не відрізнялася і включала клінічні прояви респіраторної інфекції, БОС, явища дихальної недостатності різного ступеня, помірні прояви інтоксикаційного синдрому. Температура найчастіше фіксувалася у межах нормальних показників чи на субфебрильному рівні.

Висновки. Вперше в етіологічній діагностиці ГРВІ у дітей з бронхообструктивним синдромом було застосовано мультиплексну ПЛР в режимі реального часу. Вибір методу був зумовлений можливістю одночасного детектування в одній пробі 12 респіраторних вірусів, включаючи класичні та «нові» респіраторні віруси (бокавірус, метапневмовірус та коронавірус). Встановлено, що у 2012 р. респіраторні віруси виявлялися у 75% госпіталізованих дітей з бронхообструктивним синдромом. Бокавірус І типу було ідентифіковано у більшості дітей (39,3%), також було виявлено метапневмовірус, як моно інфекцію та ко-інфікування метапневмовірусу з вірусом парагрипом І типу. Подальші дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів дозволять отримати найбільш повну картину про спектр циркуляції респіраторних вірусів і оцінити вклад нових вірусів в структуру ГРВІ та інфекційного загострення ОБ та БА.

Література

1. Research needs for the Battle against Respiratory Viruses (2013) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.who.influenza.org/pdf_2013.pgf.
2. Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Бокавіруси людини та захворювання, що вони викликають./ лекція/ 2012.
3. Arthur J.L, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathogens* 2009; **5**: e1000391.
4. Kapoor A., Slikas E., Simmonds P., et al. A newly identified Bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* 2009; **199** (2): 196 – 200.
5. De Bruijn N, Govaere E, De Vos N, De Beenhouwer H, Goubau C, Bruylants B, De Brandt C, De Telder V, Van Rossem E, Van Gysel D. Human bocavirus infection in belgian children with acute respiratory tract disease. // 27th Annual ESPID Meeting. - Brussels, Belgium, June 9-13, 2009.-Abstract.288.
6. Швець Е.Ю. Клинико-эпидемиологические особенности и диагностика бокавирусной инфекции у детей. // Автореферат дисс. ... кандидата медицинских наук. - М., 2009.