

Поклонская Н.В.1, Амвросьева Т.В.1, Безручко А.А.1, Казинец О.Н.1, Кишкурно Е.П.2, Ключко Н.Л.3, Богуш З.Ф.1, Дедюля К.Л.1, Ходин Д.В.4, Савченко Ю.А.4
**ПРОБЛЕМА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ
ЭТИОЛОГИИ**

1 – РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

2 – ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

3 – УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница»

*4 – ГУ «23 санитарно-эпидемиологический центр Вооруженных Сил Республики
Бела-русь», Минск, Беларусь*

ведение.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют собой серьезную медицинскую проблему общемирового значения. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно регистрируется около 3-5 миллиардов случаев ОКИ и 5 – 10 миллионов смертей (преимущественно в развивающихся странах) [1]. Спектр возбудителей ОКИ достаточно обширен. Он включает значительное количество как бактериальных, так и вирусных инфекционных агентов. При этом, несмотря на успехи лабораторной диагностики, достоверно установить природу этиологических агентов ОКИ удается не всегда. В Республике Беларусь в последние годы сформировалась тенденция к снижению доли ОКИ неустановленной этиологии в общей структуре заболеваемости. Вместе с тем, она продолжает оставаться достаточно высокой: в 2008 г. 19% всех ОКИ было вызвано неустановленными возбудителями [2].

Лабораторная диагностика ОКИ в Республике Беларусь базируется, преимущественно, на обнаружении бактериальных инфекционных агентов и ротавирусов. Однако по данным зарубежных исследователей (Рис.1) ротавирусы, будучи одними из самых распространенных этиологических агентов вирусных ОКИ, вызывают всего лишь около 35% данных заболеваний, остальные 65% обусловлены другими вирусами [3-8]. Исходя из этого, можно предположить, что значительная часть ОКИ неустановленной этиологии, регистрируемых в нашей стране, обусловлена кишечными вирусами, диагностика в отношении которых практической лабораторной службой в настоящее время не осуществляется. Целью настоящего исследования было определение этиологической структуры вирусных ОКИ у детей и взрослых в периоды их спорадической заболеваемости и эпидемических подъемов (на примере Минского региона). В качестве детектируемых этиологических агентов были выбраны рота-, норо-, сапо-, адено-, астровирусы.

Материалы и методы.

Исследовали пробы фекалий больных острыми гастроэнтеритами (ОГЭ) неустановленной этиологии (всего 179 образцов). Детекция РНК астровирусов методом ОТ-ПЦР осуществлялась в 152 образцах, саповирусов - в 162 образцах, норовирусов – в 140 образцах, ДНК аденовирусов – в 67 образцах. Выявление антигенов ротавирусов методом ИФА проводили в 96 образцах.

Для выделения РНК из проб клинического материала применяли коммерческий набор «РНК-СОРБ» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции RevertAid, включающего обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони, производства «Fermentas» (Литва). Для инициации реакции обратной транскрипции использовали random-праймеры (синтетические гексануклеотиды случайной последовательности). РНК подвергали предварительному нагреванию до 70° С в течение 5 минут для денатурации вторичных структур с последующим отжигом праймеров при 37° С в течение 15 минут (25° С, 25 минут в случае использования random-праймеров) и синтезом кДНК при 42°С в течение 60 минут.

Аmplификацию кДНК норовирусов 1 и 2 геногрупп и ротавирусов проводили с использованием коммерческих наборов («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Амплификацию кДНК астро-, саповирусов и ДНК аденовирусов группы F проводили с использованием нескольких наборов праймеров, ранее описанных в литературе [9-12]. Постановку реакции осуществляли в условиях, предложенных разработчиками праймеров. Результаты амплификации учитывали с помощью горизонтального гелеэлектрофореза в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом свете. Для определения размера ампликонов использовался ДНК-маркер «GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus» производства Fermentas.

Секвенирование участков ДНК проводили методом терминации цепи в термоциклической реакции с использованием коммерческого набора «DTCS Quick Start Kit» (BECKMAN COULTER) в соответствии с инструкцией. Электрофорез и анализ продуктов реакции проводили на автоматическом ДНК-анализаторе SEQ8000 (BECKMAN COULTER) с использованием соответствующих программных продуктов. Постановку реакции секвенирования проводили с использованием праймеров, которые применялись в диагностической ПЦР. Полученные нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы выравнивали друг относительно друга для удаления неясных оснований и получения консенсусных последовательностей.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных GenBank с помощью программы BLAST. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение генетических расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли с помощью программы MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версии 4 [13]. Генетические расстояния между последовательностями определяли на основании модели нуклеотидных замен Kimura, 1980.

Реконструкцию филогенетических древ проводили на основании полученных генетических расстояний с помощью алгоритма neighbor-joining, встроенного в MEGA. Достоверность топологий полученных филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (bootstrapping).

Результаты и обсуждение.

По данным зарубежных исследователей к числу наиболее распространенных и значимых вирусных агентов - возбудителей ОКИ относятся рота-, калици-, адено- и астровирусы [3-8]. Все они вызывают диаррейные заболевания, протекающие, преимущественно, в виде ОГЭ. Общие характеристики заболеваний, вызываемых

различными типами кишечных вирусов, весьма сходны. Хотя имеются и некоторые отличия, присущие той, или иной группе инфекций.

Как указывалось выше, ротавирусные инфекции на сегодняшний день являются одни-ми из самых распространенных в этиологической структуре ОГЭ вирусной этиологии. До-минирующей возрастной группой при данной инфекции являются дети, особенно младших возрастных групп (до 6 лет). Инфекция протекает, как правило, в средне-тяжелой, или тяже-лой форме. Пик заболеваемости регистрируется во время зимних месяцев. Ротавирусы дос-таточно часто вызывают вспышки, причем наиболее серьезной проблемой являются нозоко-миальные вспышки ротавирусной инфекции, которые регистрируются довольно часто в различных странах мира [3, 4, 6].

Вторыми по частоте вызываемых ими заболеваний являются вирусы семейства *Caliciviridae*, относящиеся к 2-м родам – *Norovirus* и *Sapovirus*. По результатам ведущих специали-стов норовирусы вызывают от 3,5 до 20%, а саповирусы – 4 - 11% вирусных гастроэн-теритов. Значительные различия в частоте выявления вирусов этих 2-х групп обусловлены рядом факторов, отражающих недостаточный уровень изученности проблемы в целом. Так, до настоящего времени нет четкого определения доминирующих возрастных групп для норо- и саповирусных ОГЭ. По мнению некоторых исследователей, норовирусы значительно уступают ротавирусам по распространенности среди детей. У взрослых же, особенно у пожилых пациентов, норовирусы доминируют [7, 8]. Данные, представленные в других работах, свидетельствуют о сопоставимой частоте норо- и ротавирусных ОГЭ у детей [5]. Существовавшее до недавнего времени представление о наибольшем распространении саповирусов у детей младших возрастных групп в настоящее время подвергается пересмотру в связи со значительной частотой вспышек, вызванных этими возбудителями, среди взрослого населения.

Сезонность заболеваний, вызываемых калицивирусами, также остается до конца неизученной. Распространенное до недавнего времени убеждение об осенне-зимней сезонности норовирусной инфекции в настоящее время ставится под сомнение в связи с достаточно высокой частотой вспышек данной инфекции в другое время года. Сезонность саповирусной инфекции исследована еще хуже: вследствие недостаточности накопленных данных можно лишь полагать, что пик заболеваемости, вызванной саповирусами, приходится на март-май. Важной эпидемиологической характеристикой калицивирусной инфекции является высокая частота вспышек, вызываемых этими возбудителями. Особая роль в возникновении вспышечной заболеваемости ОКИ принадлежит норовирусам. Вспышки, вызванные этой группой возбудителей, составляют от 65 до 99% всех вспышек вирусных ОКИ, причем самые массо-вые из них (около 10%) обусловлены водным, или пищевым путем передачи инфекции [5 - 7].

Кишечные аденовирусы, в отличие от остальных 3-х групп доминирующих возбу-дителей ОКИ, представляют собой крупные ДНК-содержащие вирусные агенты, обладающие сложной структурой вириона. Из всех патогенных для человека аденовирусов только 2 серо-типа – 40 и 41, принадлежащие к серогруппе F, вызывают ОГЭ. Вызываемые ими заболева-ния характеризуются наиболее тяжелым клиническим течением. Частота аденовирусных ОГЭ составляет, по разным данным, от 5 до 15%. Преобладающей возрастной группой при этой инфекции также являются дети. В отличие от заболеваний, вызванных другими

кишечными вирусами, для аденовирусных ОГЭ не характерны сезонные подъемы заболеваемости [3, 4, 6].

Для установления вклада кишечных вирусов в структуру сезонной заболеваемости ОКИ были проведены исследования по лабораторной диагностике рота-, норо-, сапо-, астро- и аденовирусов у 117 детей, госпитализированных в Детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска в январе-марте 2009 г.

Маркерами наличия у больных той, или иной инфекции были вирусная РНК (норо-, сапо-, астровирусы), ДНК (аденовирусы), или антиген (ротавирусы). Полученные результаты (Рис. 2) показали, что ротавирусная инфекция присутствовала у 26,3% заболевших, норовирусная – у 20,3%, аденовирусная – у 7,5%, сапо- и астровирусная – у 0,6%. Таким образом, расширение спектра выявляемых возбудителей позволило снизить долю вирусных ОГЭ неустановленной этиологии с 73,7% (диагностика только ротавирусов) до 44,7%.

В связи со значительным вкладом калицивирусов в формирование эпидемической заболеваемости ОКИ и высокой распространенностью этих возбудителей среди пациентов старших возрастных групп были проведены исследования, направленные на выявление калицивирусов у взрослых пациентов в периоды существенного обострения эпидситуации по ОКИ (октябрь-ноябрь 2006, май 2009 г.). Полученные результаты показали, что осенью 2006 г. на фоне подъема заболеваемости ОКИ у взрослого населения г. Минска доля проб, положительных в отношении норовирусов, составила 47,8%, а в мае 2009 г. во время вспышки ОГЭ саповирусы обнаруживались в 75% исследованных проб. На Рис. 3 представлена диаграмма, отражающая вклад калицивирусов в этиологию ОГЭ в периоды эпидемической (взрослые) и спорадической (дети) заболеваемости при проведении выборочных исследований.

Из рисунка видно, что вклад калицивирусов в этиологическую структуру заболеваемости может существенно варьировать, в зависимости от характера эпидпроцесса. Если во время спорадической заболеваемости среди детского населения норовирусы вызывали 20,3% ОГЭ, то в период эпидподъема среди взрослого населения их вклад в этиологическую структуру заболеваемости ОКИ увеличивался в 2,35 раза. Еще более значительными были различия в этиологической структуре по заболеваниям, вызванным саповирусами. Из полученных данных (рис.3) о частоте их обнаружения у детей (0,6%) на фоне относительно благополучной эпидситуации по ОКИ очевидно, что эти возбудители не играли какой-либо значимой роли в формировании заболеваемости. Однако спустя некоторое время в г. Минске была зарегистрирована вспышка ОГЭ у взрослых, во время которой доля пациентов с лабораторно подтвержденной саповирусной инфекцией составила 75%. В связи с тем, что диагностика саповирусной инфекции до настоящего времени в нашей стране не проводилась, представляется необходимым дать детальное описание основных характеристик этой вспышки.

В середине мая в закрытом военном коллективе г. Минска была отмечена вспышечная заболеваемость ОГЭ неустановленной этиологии. Заболело 26 пациентов. Инфекция протекала легко. Клинические симптомы у заболевших были характерны для вирусных ОГЭ (Рис. 4): диарея (84,6%), боль в животе (76,9%), тошнота (61,5%), рвота (34,6%), лихорадка (7,7%). Выздоровление наступало на 2-е – 3-е сутки от начала заболевания. Результаты бактериологического

обследования клинического материала на наличие патогенных энтеробактерий были отрицательными, на основании чего было сделано предположение о вирусной этиологии инфекции. Для этиологической расшифровки вспышки были проведены лабораторные исследования, направленные на выявление маркеров основных групп кишечных вирусов (рота-, норо-, астро-, аденовирусов 40 и 41 т., энтеровирусов). С целью изучения возможности участия водного фактора в распространении инфекции были проведены санитарно-вирусологические исследования водопроводной воды на предмет ее вирусной контаминации (в 3-х точках).

Результаты лабораторных исследований проб фекалий, полученных от больных ОГЭ, показали отсутствие АГ ротавирусов, а также генетического материала норо-, астро-, энте-ровирусов и аденовирусов 40 и 41 типов. Исследования методом ОТ-ПЦР с праймерами к участку гена, кодирующего капсидный белок VP1 саповирусов, выявило наличие в 75 % исследованных проб полосы, соответствующей по размеру специфическому продукту данной реакции - 434 нт (Рис.5).

В связи с отсутствием диагностических тест-систем и специфических контролей, для подтверждения специфичности полученного результата было проведено секвенирование ам-плифицированного фрагмента ДНК. Результатом проведенных работ стала нуклеотидная последовательность, размер которой после ручной коррекции и удаления нераспознанных оснований составил 360 нт. Поиск гомологичных последовательностей в базе данных NCBI показал, что нуклеотидные последовательности, обладавшие максимальной степенью сходства с исследуемой (87-99%), принадлежали саповирусам. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей между собой выявило их практически полную идентичность (99 – 100% совпадения), что указывало на специфичность полученного продукта ПЦР.

На основании результатов ПЦР и ДНК-анализа, был сделан вывод о саповирусной этиологии вспышки ОГЭ.

Полученные результаты указывают на существенную роль калицивирусов в формировании заболеваемости ОГЭ в Минском регионе. Наиболее ощутимый вклад эти возбудители вносили в периоды эпидподъемов и вспышек ОГЭ, особенно среди взрослого населения. Та-кая ситуация является нехарактерной для других групп кишечных вирусов. Как правило, ОГЭ вирусной этиологии в большей степени страдают дети, а сформированный в детском возрасте иммунный ответ является достаточной защитой против инфекции в более зрелом возрасте. Основной причиной отсутствия, или недостаточности иммунной защиты в отношении калицивирусов является их значительное генетическое и, как следствие, антигенное многообразие. На сегодняшний день известно более 30 генотипов норовирусов, которые объединяются в 3 крупные геногруппы и около 10 генотипов саповирусов, входящих в 4 геногруппы. Следует отметить, что серологическая идентификация калицивирусов практически невозможна из-за отсутствия общих группоспецифических антигенных детерминант. Поэтому единственным средством идентификации вирусов этой группы являются молекулярно-генетические методы. Исходя из этого были проведены исследования, направленные на молекулярное типирование калицивирусов – норо- и саповирусов, циркулировавших в г. Минске в 2009 г.

Генотипирование обнаруженных норовирусов осуществляли с помощью ПЦР с типос-пецифическими праймерами (определяли принадлежность вируса к 1 или 2 геногруппе), а также с помощью секвенирования (установление генотипа в пределах геногруппы). Полученные результаты показали, что абсолютное большинство положительных проб содержали норовирусы геногруппы II - РНК этих вирусов была выявлена в 94,4% положительных проб (n=18), тогда как норовирусы геногруппы I были обнаружены только в 5,6% положительных проб. Секвенирование выявленных норовирусов позволило провести их генотипирование. По результатам филогенетического анализа (Рис.6) установлена принадлежность всех выявленных норовирусов геногруппы II к 10 генотипу вируса. Единственный норовирус геногруппы I принадлежал к 4 генотипу. Для молекулярного типирования обнаруженных саповирусов была проведена филогенетическая реконструкция (Рис. 7) на основании фрагмента гена VP1 размером 212 нт 2-х саповирусов, обнаруженных в исследованных образцах, и 29 саповирусов, принадлежащих к различным геногруппам и генотипам, нуклеотидные последовательности которых были использованы для сравнения и получены из международной базы данных NCBI. В качестве внешней группы использовали фрагмент нуклеотидной последовательности саповируса свиней, принадлежащего к геногруппе III (PEC). Из рисунка 8 видно, что исследуемые нуклеотидные последовательности входят в кластер геногруппы I, субкластер генотипа 2. Таким образом, результаты молекулярного типирования свидетельствовали о том, что вспышка в закрытом коллективе была вызвана саповирусами GI.2. Проведенный филогенетический анализ показал, что в пределах генотипа нуклеотидные последовательности саповирусов обнаруживали, в среднем, 3,0% различий. Доля различий между последовательностями исследуемых вирусов (№№ 7543, 7545) и прототипным штаммом Parkville (1994) составила 2,8%, что указывает на невысокий уровень генетической изменчивости саповирусов в пределах генотипа GI.2. Исследуемые нуклеотидные последовательности имели максимальное сходство с последовательностями саповирусов, циркулировавших в 2005 г в России и Украине (Тула, Челябинск, Одесса), а также вызвавших вспышку в Венгрии осенью 2008 г (Kescskemet). Средняя доля различий между ними не превышала 0,3%.

Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о значительном вкладе признанных доминирующих групп кишечных вирусов (калици-, астро-, аденовирусов) в формирование заболеваемости ОКИ неустановленной этиологии в Минском регионе. Полученные результаты диктуют необходимость совершенствования лабораторной диагностики ОКИ с обязательным включением в нее методов выявления калици-, астро-, аденовирусов. Вследствие значительного разнообразия методов и средств лабораторной диагностики в отношении этих вирусов необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на определение их сравнительных характеристик и стандартизацию диагностических подходов, используемых в различных учреждениях. Существенную помощь в организации и внедрении дифференциальной лабораторной диагностики ОКИ неустановленной этиологии в целом по стране может оказать разработка и внедрение единого нормативно-методического документа, регламентирующего порядок и методы исследований, а также создание конкурентоспособных отечественных диагностических препаратов.

Литература

1. Snyder JD, Bull WHO, 1982.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2008 г.».
3. Wilhelmi, I. Viruses causing gastroenteritis / I. Wilhelmi, E. Roman, A. Sanchez-Fauquier // Clin. Microbiol. Infect. 2003. V. 9. P. 247–262.
4. Bates, P. R. Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus and astrovirus gastroenteritis in children / P. R. Bates [et al.] // J Med Virol. 1993;39(3):224–8.
5. Петрова, М. С. Клиническая характеристика норовирусной инфекции у детей в сб. «Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины»: материалы Российской науч.-практ. конференции, посвященной 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова / М. С. Петрова [и др.]. СПб.: ВМедА, 2006. 340 с.
6. Goodgame, R. W. Viral causes of diarrhea / R. W. Goodgame // Gastroenterol Clin North Am. 2001. V. 30. P. 779–795.
7. Fankhauser, R. L. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States / R. L. Fankhauser [et al.] // J Infect Dis. 1998. V. 178. P. 1571–1578.
8. Lopman, B. Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000 / B. Lopman [et al.] // Emerg Infect Dis, 2003. V. 9, № 1. P. 90–96.
9. Vinjé, J. International Collaborative Study to Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses / J. Vinjé [et al.] // J Clin Microb. 2003. V. 41. № 4. P. 1423–1433.
10. Noel, J. Typing of Human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing / J. Noel [et al.] // J Clin Microb. 1995. V. 33. № 4. P. 797–801.
11. Rohayem, J. Assessing the Risk of Transmission of Viral Diseases in Flooded Areas: Viral Load of the River Elbe in Dresden during the Flood of August 2002 / J. Rohayem [et al.] // Intervirology. 2006. V. 49. P. 370–376.
12. Yan, H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR / H. Yan [et al.] // J Virol Met. 2003. V. 114. P. 37–44.
13. Tamura, K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / K. Tamura [et al.] // Mol Biol Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.

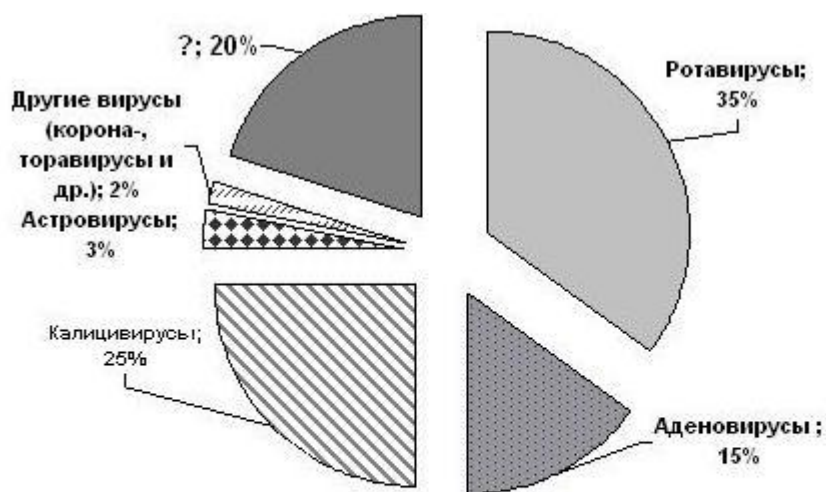


Рис. 1 Этиологическая структура вирусных гастроэнтеритов
(по результатам зарубежных исследований [3-8])

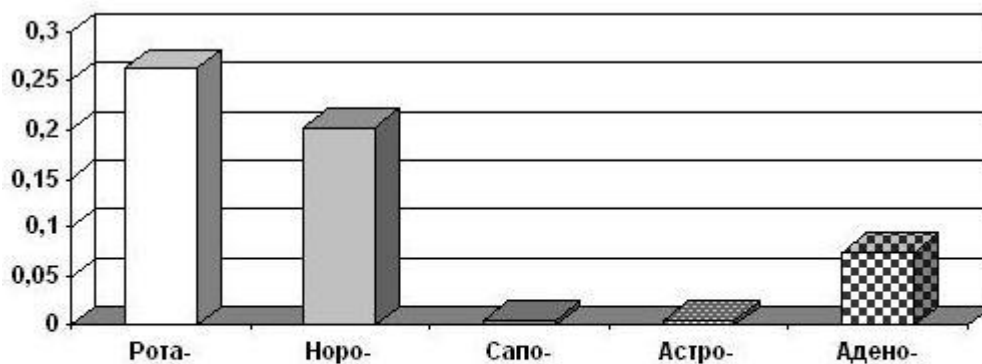


Рис. 2 Результаты лабораторной диагностики основных групп кишечных вирусов у детей



Рис. 3 Результаты лабораторной диагностики калицивирусов в периоды эпидемической и спорадической заболеваемости у пациентов разных возрастных групп.

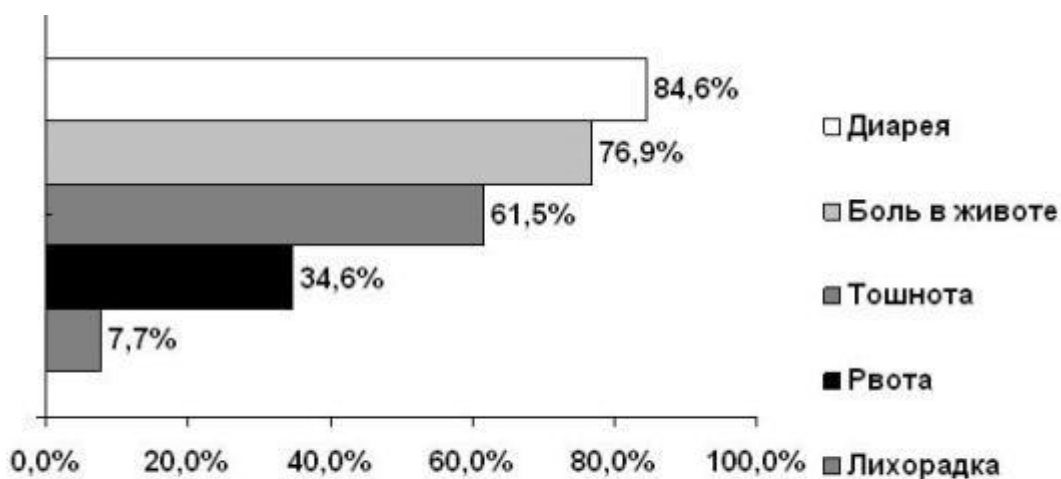


Рис. 4 Клинические проявления ОГЭ во время вспышки в мае 2009 г.

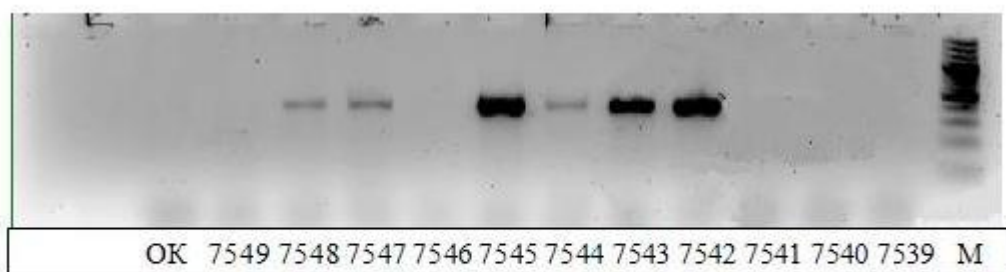


Рис. 5 Результат ОТ-ПЦР с праймерами к участку гена, кодирующего капсидный белок VP1 саповирусов. Образцы №№ 7542 – 7549 – пробы фекалий.

