

Рустамова Л. И.¹, Алиева Н. Н.¹, Кулиева З. М.², Азизова Н. А.², Мамедова М. Н.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ЭНТЕРОВИРУСНЫМИ ГАСТРОЭНТЕРИТАМИ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ НА СОЦЭКОСИСТЕМНОМ, КЛЕТОЧНОМ И СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ

¹Национальный НИИ медицинской профилактики им. В. Ахундова Министерства здравоохранения АР, Аз 1065, Баку, Азербайджан;

²кафедра педиатрии Азербайджанского государственного института усовершенствования врачей им. А. Алиева
Министерства здравоохранения АР, Аз 1012, Баку, Азербайджан

Для корреспонденции: Рустамова Лала Ислаховна, канд. мед. наук, доцент, зав. отделением вирусологии.
E-mail: lala.rustamova.1967@mail.ru

♦ Эпидемический надзор за энтеровирусными инфекциями является актуальной проблемой здравоохранения во многих странах мира и предусматривает организацию контроля на различных уровнях. Цель настоящего исследования заключалась в изучении некоторых признаков энтеровирусной инфекции на социальном, клеточном и субклеточном уровнях. В период 2010—2011 гг. исследовали фекальные суспензии 121 ребенка и 127 взрослых. Использовали серологический, вирусологический и молекулярно-генетический методы. Изучены следующие маркерные признаки энтеровирусов: признак миотропизма, цитопатического действия S, d и re_{40} . Установлена частота встречаемости энтеровирусной инфекции в разных возрастных группах; 0—6 мес — 22,0%, 7—11 мес — 41,1%, 1—2 года — 39%, 2—14 лет — 19%. Серотипический пейзаж выделенных энтеровирусов был следующим: Коксаки А типов 17, 18, 20 и 21. Показано, что для экспресс-диагностики энтеровирусной инфекции необходимо проводить индикацию РНК энтеровирусов в различных биопробах одновременно. Установлено, что культуральный и серологический методы весьма важны для ретроспективного эпидемиологического анализа энтеровирусной инфекции.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор; маркерные признаки; серотипический пейзаж; энтеровирусы.

Для цитирования: Российский медицинский журнал. 2015; 21(2): 36—39.

Rustamova L.I.¹, Alieva N.N.¹, Kulieva Z.M.², Azizova N.A.², Mamedova M.N.

THE RESULTS OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF ENTEROVIRUS GASTROENTERITIS ON SOCIAL ECOSYSTEM, CELLULAR AND SUB-CELLULAR LEVELS IN AZERBAIJAN

¹The V. Akhundov National research institute of medical prevention of Minzdrav of the Republic of Azerbaijan, Az 1065 Baku, the Republic of Azerbaijan; ²The A. Aliev Azerbaijan state institute of post-graduate training of physicians of Minzdrav of the Republic of Azerbaijan, Az 1012 Baku, the Republic of Azerbaijan

♦ The epidemiological surveillance of enterovirus infections is an actual issue of health care in many countries and provides organization of control at different levels. The study was organized to examine particular characteristics of enterovirus infection at social ecosystem, cellular and sub-cellular levels.

During 2010—2012 the fecal suspensions from 121 children and 127 adults were analyzed. The serological, virological and molecular genetic methods were applied. The following marker characteristics of enterovirus were examined: characteristics of miotropism, cytopathic effect, s, d and re_{40} . The rate of occurrence of enterovirus infection in different age groups was established: 0—6 months — 22%, 7—11 months — 41.1%, 1—2 years — 39%, 2—14 years — 19%. The serotype-specific landscape of isolated enteroviruses was as follows: Coxsackie A types 17, 18, 20 and 21. It is demonstrated that express diagnostic of enterovirus infection requires applying indication of RNA enterovirus in different bio-samples simultaneously. It is established that cultural and serological methods are rather important for retrospective epidemiological analysis of enterovirus infection.

Keywords: epidemiological surveillance; marker characteristic; serotype-specific landscape; enterovirus.

Citation: Rossiiskii meditsinskii zhurnal. 2015; 21 (2): 36—39.

For correspondence: Lala Rustamova, MD, PhD; e-mail: lala.rustamova.1967@mail.ru

При анализе эпидемиологической ситуации в Азербайджанской Республике (РА) последнее десятилетие, прежде всего вызывает тревогу устойчивый рост заболеваемости инфекциями, в борьбе с которыми в недалеком прошлом были достигнуты существенные успехи. Отсутствие стабильной эпидемиологической ситуации в стране характеризуют эпидемические вспышки дифтерии в 1993—1996 гг., резкие периодические подъемы заболеваемости гепатитом А, краснухой, эпидемическим паротитом, некоторыми энтеровирусными инфекциями [1—3].

Эпидемиологический надзор за энтеровирусными инфекциями является актуальной проблемой здравоохранения во многих странах мира, в том числе в Азербайджане, и требует организации контроля на различных уровнях [4—6].

С учетом вышесказанного эпидемиологический надзор за энтеровирусными инфекциями на территории республики предусматривает следующее:

- ♦ на социальном уровне слежение за показателями и тенденцией динамики заболеваемости во времени, частотой выявляемости в отдельных группах населения;
- ♦ на клеточном уровне слежение за динамикой биологических свойств, возбудителей энтеровирусных инфекций (вирулентностью, серотипической характеристикой);
- ♦ на субклеточном (молекулярном) уровне слежение за молекулярно-генетической характеристикой циркулирующих штаммов энтеровирусов.

Материал и методы

Исследовали фекальные суспензии больных, поступивших в различные клиники инфекционных болезней Баку с клиническими диагнозами "инфекционный энтерит", "кишечная инфекция неясной этиологии", "острое респираторное заболевание", "бронхопневмония", "пе-

ринатальная инфекция" и "сепсис". За 2010—2011 гг. всего обследован 121 ребенок в возрасте до 14 лет и 127 взрослых.

Изучены следующие маркерные признаки вирусов Коксаки А: МТ — миотропизм; ЦПД — цитопатическое действие в культуре клеток; S — свойство аттенуированных штаммов образовывать мелкие бляшки под агаровым покрытием; d — задержка размножения аттенуированных штаммов под слоем агара с низким содержанием бикарбоната натрия (0,07%) по сравнению с высоким содержанием этого вещества (0,45%) (для аттенуированных штаммов разница в титрах составляла 3—5 lg БОЕ); gct_{40} — пониженная способность аттенуированных штаммов размножаться при 40°C.

Для аттенуированных штаммов эти признаки обозначались знаком -, для нейровирулентных +.

Вирусологическую диагностику Коксаки А-инфекций проводили с использованием реакции нейтрализации в культуре клеток и цветной пробы Солка. В реакции нейтрализации применяли типоспецифические иммунные сыворотки против вирусов Коксаки А типов 17, 18, 20 и 21, Коксаки В типов 3, 5 и ЕСНО типов 14, 16, полученные из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова (Москва).

Реакцию нейтрализации и цветную пробу Солка выполняли согласно стандартной методике. Первичную культуру фибробластов эмбриона человека готовили по общеизвестной методике [7]. Для изучения маркерного признака МТ эксперименты проводили на 2—3-дневных белых мышках-сосунках. Для этого молодых мышечей заражали внутрибрюшинно 0,2 мл вирусологически подтвержденного материала. За животными наблюдали 14 дней. По истечении указанного срока по наличию параличей передних конечностей устанавливали патогенность энтеровирусов Коксаки А для животных. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с правилами, изложенными в методических указаниях "Деонтология медико-биологического эксперимента".

Для экспресс-диагностики энтеровирусной инфекции использовали молекулярно-генетический метод-индикацию РНК энтеровирусов в сыворотке крови обследуемых больных с помощью обратной транскриптной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-системы "Амплиенс Enterovirus-207" производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии.

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием ревертазы M-MLV фирмы "Promega" (США) согласно инструкции по применению. Ферментативную амплификацию проводили в амплификаторе Терцик фирмы "ДК-технология" в режиме: 94°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 45 с — 25 для 1-го раунда ПЦР 94°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 45 с — 25 для 2-го раунда ПЦР. Продукты амплификации выявляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием трис-боратной буферной системы. Энтеровирусы выделяли в культуре клеток НЕР-2, полученной из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова (Москва), в реакции нейтрализации с использованием типоспецифических иммунных сывороток.

Представление цифровых данных проводили с помощью дескриптивной статистики в виде степенных средних ($M \pm m$). Для проверки статистических гипотез использовали параметрические (t -критерий Стьюдента) критерии при критическом уровне значимости нулевой гипотезы, равном 5%. Обработку данных выполняли с помощью электронных таблиц Microsoft Word 2000, Excel и программы Statistica 6.0 для персональных компьютеров [8].

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлена частота встречаемости энтеровирусной инфекции в разных возрастных группах: 0—6 мес — 22%, 7—11 мес 41,1%, 1—2 года 39%, 2—14 лет 19%. Как видно из результатов, наибольшая выявляемость отмечена в возрастной группе 7—11 мес (41,1%). Серотипический пейзаж выделенных энтеровирусов Коксаки А: Коксаки А типов 17, 18, 20 и 21. В одном случае вирусы выявлены в ассоциации Коксаки А 17 и 18, в остальных случаях выделен только 1 тип вируса.

Типовой спектр выделенных вирусов Коксаки А у больных с различными клиническими диагнозами отличался разнообразием: при кишечной инфекции неясной этиологии Коксаки А типов 18, 20, 21; острым респираторном заболевании Коксаки А типов 18, 20; острым респираторном заболевании с диареей Коксаки А типов 21; инфекционном энтерите Коксаки А типов 18, 19, 20, 21; бронхопневмонии Коксаки А типов 18, 21.

Маркерный признак МТ изучали на 2—3-дневных белых мышках-сосунках. Всего было заражено 95 молодых мышечей. Из них у 32 особей наблюдались параличи передних конечностей различной степени выраженности. Мыши с вялыми параличами конечностей были заражены патологическим материалом, положительным на вирус Коксаки А типов 18 и 20. Таким образом, признак МТ у этих вирусов был положительным и данные штаммы являлись вирулентными.

Маркерный признак ЦПД исследовали на первичной культуре клеток фибробластов эмбриона человека. В культуре клеток, зараженных положительными на вирусы Коксаки А пробами, через 48 ч отмечался цитопатический эффект как признак патогенности. Степень выраженности цитопатического эффекта была различной в зависимости от типа вирусного штамма: с вирусными штаммами Коксаки А типов 19, 21 — 25%; Коксаки А типов 18, 20 — 50%; Коксаки А типов 19, 21 — 75% и Коксаки А типов 18, 20 — 100%.

Маркерный признак S устанавливали в первичной культуре клеток фибробластов эмбриона человека под агаровым покрытием. Штаммы вируса Коксаки А типа 20 образуют мелкие бляшки, типов 18 и 21 — крупные.

Маркерный признак d также определяли в первичной культуре клеток фибробластов эмбриона человека, он был положительным для изолированных вирусов Коксаки А.

Изучение маркерного признака gct_{40} показало, что для выделенных штаммов вирус Коксаки А типа 21 этот признак был положительным, что свидетельствовало о вирулентности указанного штамма.

Обобщенные результаты изучения маркерных признаков вирусов Коксаки А, циркулирующих в АР и изолированных у детей, представлены в табл. 1.

Эпидемиологический анализ особенностей территориального распределения энтеровирусных инфекций в АР позволил выявить следующие закономерности: неравномерность распределения энтеровирусных инфекций в экономикогеографических районах республики; основной вклад в заболеваемость г. Баку и Куба-Хачмасского района (первого за счет городских детей, второго — сельских жителей); умеренность снижения заболеваемости во всех перечисленных контингентах двух районов; выделение группы районов с преобладанием среднего уровня заболеваемости, требующих постоянного эпидемиологического контроля.

Изучение маркерных признаков некоторых энтеровирусов, циркулирующих и изолированных среди населения республики, позволило определить степень их вирулентности. Полученные данные послужили ценным

Таблица 1

Некоторые маркерные признаки вирусов Коксаки А, изолированных у детей

Маркерный признак	Коксаки А18	Коксаки А20	Коксаки А21
MT	+	+	+
ЦПД, %	50	50	25,75
S	Крупные бляшки	Мелкие бляшки	Крупные бляшки
	+	-	+
d	+	+	+
rct ₄₀	-	-	+

Таблица 2

Результаты вирусологического обследования населения АР на неполиомиелитную энтеровирусную инфекцию

Контингент обследованных	Число обследованных	Положительный результат					
		Коксаки А		Коксаки В		ЕСНО	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Дети до 14 лет	121	36	29,7	26	21,4	47	38,8
Взрослые	40	3	7,5	15	37,5	10	25,0
Здоровые дети	87	—	—	32	36,7	21	24,1
Всего ...	248	39	15,7	73	29,4	78	31,4

Таблица 3

Частота выявления различных групп неполиомиелитных энтеровирусов в зависимости от клинического диагноза (1999—2004 гг.)

Диагноз	Число обследованных	Положительный результат					
		Коксаки А		Коксаки В		ЕСНО	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Кишечная инфекция неясной этиологии	85	22	25,8	5	5,8	14	16,4
Инфекционный энтерит	27	9	33,3	5	18,5	—	25,0

материалом и важным элементом для совершенствования организации эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями в Азербайджане.

За анализируемый период в большинстве случаев выделяли копрокультуры (84,5%), на долю гемокультур приходилось 5,8%. В других материалах (моча, мазки из зева и носоглотки) маркерные признаки обнаруживали в единичных случаях.

Выделенные от людей энтеровирусные штаммы в этот период были представлены 9 серотипами основных групп. Чаще встречались вирусы Коксаки А серотипов 18 и 20, 2 серотипа (А21 и 24) изолированы в единичных случаях, на каждый из них приходилось менее 3% от общего количества выделенных энтеровирусов (табл. 2).

При анализе зависимости частоты изоляции энтеровирусов от возраста обследованных установлено, что вирусы чаще выделяли у детей до 2 лет — 41,1% положительных результатов.

Типирование выделенных штаммов неполиомиелитных энтеровирусов показало, что обнаруженные у больных детей и взрослых вирусы в основном были представлены энтеровирусами ЕСНО и Коксаки А, в то

время как у здоровых лиц превалировали энтеровирусы группы Коксаки В. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей относительно циркуляции вирусов Коксаки В среди здоровых детей преимущественно ясельного возраста, с периодической сменой типового состава вирусов, среди которых доминирующими были серотипы 3 и 5.

Частота выявления различных энтеровирусов Коксаки А, В и ЕСНО также варьировала в зависимости от клинического диагноза, о чем свидетельствуют данные, представленные в табл. 3.

Таким образом, установлена высокая частота выявления неполиомиелитных энтеровирусов Коксаки группы А и ЕСНО среди больных детей и взрослых с клиническими диагнозами "кишечная инфекция неясной этиологии" и "инфекционные энтериты", вирусов Коксаки группы В среди здоровых лиц из группы риска. Выявленная тенденция к росту частоты изоляции этих вирусов у больных и здоровых свидетельствует о необходимости мониторинга неполиомиелитных энтеровирусных инфекций в условиях прекращения циркуляции диких штаммов полиовирусов в Азербайджане.

Выделение энтеровируса одного и того же серотипа из фекалий и сыворотки больных энтеровирусной инфекцией на фоне подъема заболеваемости дает нам возможность предположить, что он является этиологическим агентом энтеровирусной инфекции. Выделение неполиомиелитных серотипов энтеровируса из фекалий иногда служит единственным способом подтверждения данной инфекции. С помощью метода парных сывороток установлено, что из 72 лиц с положительным результатом при культуральном исследовании у 65 (90%) энтеровирусы выделены из кала, диагноз был подтвержден серологически.

При исследовании фекальных проб на ротавирусы и аденовирусы ротавирусный антиген определялся в 4% случаев, аденовирусный антиген — в 1,7%.

При выполнении ПЦР подтверждение энтеровирусной этиологии в исследовании отмечено в 98% случаев.

Наши наблюдения показали преимущественно доброкачественное течение энтеровирусной инфекции, при этом у 87% больных регистрировались различные серотипы энтеровирусов и в сыворотке крови.

Все дети поступали в стационар в первые 2—3 дня заболевания. У 83,1% больных был отмечен подъем температуры тела до 38—39°C. Характерным в первые дни был катаральный синдром в виде гиперемии задней стенки глотки, дужек и зернистости задней стенки глотки. Конъюнктивит диагностировали в 17,3% случаев, гепатомегалию — в 16,4%. У 7,08% больных имелись проявления герпетической ангины, у 10,8% — диарея. Миалгия зарегистрирована в 8,5% случаев.

По нашим наблюдениям, при диагностике энтеровирусной инфекции наряду с фекалиями и сывороткой крови исследование носоглоточных смывов позволило повысить уровень детекции энтеровирусов. В нашем исследовании выявляемость энтеровирусов при комбинированном изучении повысилась на 36,8% по сравнению с исследованием только фекалий, где обычно чаще всего выявляют энтеровирусы. Достаточно часто РНК энтеровирусов выявляли в сыворотках крови. Известно, что их выделение из сывороток крови в культуре клеток малоэффективно вследствие образования иммунных комплексов с нейтрализующими антителами. При ПЦР этот фактор устраняется [9, 10].

Таким образом, в результате эпидемиологического надзора за энтеровирусной инфекцией в Азербайджане доказано, что для экспресс-диагностики энтеровирус-

ной инфекции необходимо проводить индикацию РНК энтеровирусов параллельно в различных биопробах. Установлено, что культуральный и серологический методы важны для ретроспективного эпидемиологического анализа энтеровирусной инфекции. Комбинированное исследование различных биопроб на энтеровирусы повышает уровень их выявляемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Гурбанов С.М. и др. Изучение молекулярно биологических и вирусологических маркеров как компонент организации эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями. В кн.: *Труды Института Медицинской Профилактики*. Баку, 2007; 1: 537.
2. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Алиев М.Ш. и др. Опыт организации эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями в Азербайджане и России. В кн.: *Материалы конференции, посвященной 85-летию Санитарно-эпидемической службы*. Новосибирск; 2007; 473—7.
3. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Аскеров В.Ф., Алиев К.Н. Заболеваемость энтеровирусными гастроэнтеритами в Азербайджане в 2000—2004 гг. *Детские инфекции*. 2007; 6(3): 76—8.
4. Брико Н.И. Эпидемиологический надзор — инструмент выявления новых нозологических форм болезней. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2004; 1: 4—7.
5. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Тагизаде Ф.Д. и др. Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости Коксаки А вирусной инфекции среди детей в Азербайджане. *Журнал гигиены, эпидемиология и иммунология*. 2007; 1: 58—62.
6. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Тагизаде Ф.Д., Алиев К.Н. Эпидемиологическое маркирование штаммов вирусов Коксаки В изолированных у детей в Азербайджане. *Журнал инфекционной патологии*. 2007; 14(1—4): 6—13.
7. Лябина Л.М., Соминина А.А. и др. Методические рекомендации по работе с клеточными культурами и средами. Л; 1975.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л; 1962.
9. Голицына Л.Н., Новикова, Домбровская Л.К. и др. Оценка разработанного "nested" варианта полимеразной цепной реакции при выявлении энтеровирусов у больных. *Вопросы вирусологии*. Москва, 2002; 5: 41—3.
10. Enteroviral polymerase chain reaction in the investigation of aseptic meningitis. *J. Medical Virology*. 2004; 50(2): 204—8.

REFERENCES

1. Aliev N.N., Rustamova L.I., Gurbanov S.M. i dr. *The study of molecular biological and virological markers as a component of an entity epidemiological surveillance of enterovirus infections [Izuchenie molekulyarno-biologicheskikh i virusologicheskikh markerov kak komponent organizatsii epidemiologicheskogo nadzora za enterovirusnymi infektsiyami]*. Trudy Instituta Meditsinskoj Profilaktiki. Baku; 2007; 1. (in Russian)
2. Aliev N.N., Rustamova L.I., Azaev M.Sh. i dr. *Experience in organizing epidemiological surveillance of enterovirus infections in Azerbaijan and Russia [Opyt organizatsii epidemiologicheskogo nadzora za enterovirusnymi infektsiyami v Azerbaydzhane i Rossii]*. Materialy konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu Sanitarно-epidemiologicheskoi sluzhby. Novosibirsk; 2007; 473—7. (in Russian)
3. Aliev N.N., Rustamova L.I., Askerov V.F., Aliev K.N. *The incidence of enterovirus gastroenteritis in Azerbaijan in 2000—2004 [Zabolevaemost' enterovirusnymi gastroenteritami v Azerbaydzhane v 2000—2004 gg.]*. Detskie infektsii. Moskva, 2007; 6(3): 76—8. (in Russian)
4. Briko N.I. Epidemiological surveillance — a tool to identify new nosological forms of disease. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2004; 1; 4—7. (in Russian)
5. Aliev N.N., Rustamova L.I., Tagizade F.D. i dr. Epidemiological retrospective analysis of Coxsackie A virus infection among children in Azerbaijan. *Zhurnal gigiena, epidemiologiya i immunobiologiya*. 2007; 1: 58—62. (in Russian)
6. Aliev N.N., Rustamova L.I., Tagizade F.D., Aliev K.N. Epidemiological marking Coxsackie virus strains isolated in children in Azerbaijan. *Zhurnal infektsionnoy patologii*. 2007; 14 (1—4): 6—13. (in Russian)
7. Lyabina L.M., Sominina A.A. i dr. *Guidelines for working with cell cultures and environments [Metodicheskie rekomendatsii po rabote s kletochnymi kul'turami i sredami]*. Leningrad; 1975: 41. (in Russian)
8. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical methods in microbiological studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962: 82—114.
9. Golitsyna L.N., Novikova, Dombrovskaya L.K. i dr. Evaluation developed "nested" variant polymerase chain reaction detection of enteroviruses in patients. *Voprosy virusologii*. 2002; 5: 41—3. (in Russian)
10. Enteroviral polymerase chain reaction in the investigation of aseptic meningitis. *J. of Medical Virology*. 2004, 50 (issue 2), p. 204—8.

Поступила (received) 19.03.14