

Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь*

Острые гастроэнтериты (ОГЭ) относятся к числу распространенных инфекций практически во всех странах мира. Так, по данным ВОЗ, среди детей младше 5 лет ежегодно в мире регистрируется более 700 миллионов случаев диареи [10]. Смертность от диарейных заболеваний оценивается в 5 – 7 миллионов случаев в год [4,5]. В структуре данной группы заболеваний наибольшую проблему для практического здравоохранения представляют так называемые ОГЭ (или ОКИ) неустановленной этиологии, возбудители которых не удается идентифицировать.

По современным представлениям к числу доминирующих возбудителей вирусных ОГЭ относится довольно широкий спектр агентов и среди них – рота-, норо-, адено-, астро-, энтеро-, коронавирусы [11]. При этом удельный вес различных возбудителей в этиологической структуре заболеваемости весьма варьирует. До недавнего времени считалось, что ротавирусы занимают первое место как по частоте вызываемых ими заболеваний, так и по тяжести их течения [3]. Однако в свете последних данных происходит пересмотр данной точки зрения. Результаты недавних исследований, проведенных в Финляндии, свидетельствуют о равной частоте заболеваний среди детей, обусловленных рота-и норовирусами. Весьма незначительное преобладание рота-по

сравнению с норовирусной инфекцией выявлено московскими исследователями при анализе заболеваемости вирусными гастроэнтеритами среди детей до 7 лет: 35,4% случаев было вызвано норовирусами, 44,6%-ротавирусами, еще 12,3% были обусловлены смешанной норо-и ротавирусной инфекцией [2]. Кроме того, если в детском возрасте частота заболеваемости рота-и норовирусной инфекцией сопоставима, то среди взрослых и, особенно пожилых пациентов, норовирусы занимают безусловно доминирующее положение [5,6]. Ранее существовавшее убеждение о том, что норовирусы вызывают значительно более легкие формы заболевания, чем ротавирусы, в настоящее время также подвергается пересмотру. Так, по результатам сравнительных клинических исследований рота-и норовирусных гастроэнтеритов у детей в Испании и Японии не выявлено существенных различий в тяжести их течения. Результаты эпидемиологического мониторинга показали, что именно норовирусы являются причиной абсолютного большинства (92%) вспышек ОГЭ. При этом самые массовые из них (около 10%) были связаны с водным или пищевым путем распространения вируса [9]. Как известно, норовирусы обладают более высокой устойчивостью к хлору, чем все остальные кишечные вирусные агенты [7], что определяет их способность

сохраняться в питьевой воде и пищевых продуктах и служить источником массового заражения.

Несмотря на значительный прогресс в изучении этиологии вирусных ОГЭ, проблема качественной и своевременной диагностики этой группы заболеваний остается до конца нерешенной даже в высокоразвитых странах. Так, 10 лет назад диагностическим службам США удавалось достоверно выявить этиологию вирусных гастроэнтеритов лишь в 50% случаев [8]. Благодаря развитию и широкому внедрению молекулярных методов исследований, доля вирусных ОГЭ неустановленной этиологии за последние 15 лет уменьшилась, однако и сегодня она составляет не менее 30 – 40% всех регистрируемых.

Что касается Республики Беларусь, то до недавних пор отечественное практическое здравоохранение испытывало реальные трудности в дифференциальной диагностике ОГЭ. Об этом свидетельствуют официальные данные о показателях инфекционной заболеваемости в 2007-2008 гг., согласно которым 23,9-19 % всех ОКИ, зарегистрированных в Беларуси, приходилось на долю инфекций вызванных неустановленными возбудителями [1]. В сложившейся ситуации очевидно, что ежегодно почти четверть регистрируемых ОКИ вызвано агентами, в отношении которых диагностика не проводится, или оказывается неэффективной. Сегодня данная группа инфекций приносит государству значительный материальный ущерб, вызывая не только большой дискомфорт у больных, но и миллионы потерянных рабочих дней в году.

Следует отметить, что в нашей стране диагностика кишечных вирусных инфекций базируется преимущественно на выявлении рота- и энтеровирусной инфекции у пациентов с ОКИ. Однако в свете вышеприведенных данных такой подход представляется неправомерным. Очевидно, что существование значительной части вирусных ОКИ неустановленной этиологии было обусловлено отсутствием разработанных диагностических подходов, методов и средств для индикации и идентификации целого ряда других кишечных

вирусов и, в первую очередь, норо-, астро-, аденовирусов. Учитывая тот факт, что диагностика в отношении этих возбудителей отечественными лабораториями не осуществляется, данные об этиологической структуре заболеваемости вирусными ОГЭ в нашей стране отсутствуют. Весьма ограничены также данные о вкладе вирусных кишечных патогенов во вспышечную и сезонную заболеваемость ОКИ.

Исходя из вышеизложенного, настоящая работа посвящена разработке современной схемы дифференциальной диагностики вирусных ОГЭ на основе использования репрезентативных и доступных для практического здравоохранения методов выявления диагностически значимых маркеров возбудителей. В основе применяемого для этих целей методического подхода был положен принцип комплексности, дифференцированности и оптимальности проводимых диагностических исследований с использованием спектра современных методов (клинических, вирусологических, серологических, молекулярно-генетических), направленных на индикацию широкого круга энтеротропных вирусных агентов: ротавирусов (РВ), норовирусов (НВ), аденовирусов (АДВ), астровирусов (АсВ), энтеровирусов (ЭВ).

Материал и методы

В ходе выполнения проекта обследован 231 больной, в том числе 190 детей и 41 взрослый пациент. Всего было проведено 1401 исследование методами ПЦР и ОТ-ПЦР, 312 исследований методом ИФА. Методом ОТ-ПЦР в отношении норовирусов 1 геногруппы было исследовано 231 проба (от 190 детей и 41 взрослого), норовирусов 2 геногруппы – 231 проба (от 190 детей, 41 взрослого), астровирусов-231 проба (от 190 детей, 41 взрослого), саповирусов – 165 проб (от 124 детей, 41 взрослого), ротавирусов-175 проб (от 134 детей, 41 взрослого), энтеровирусов – 137 проб (от 96 детей, 41 взрослого). Методом ИФА в отношении ротавирусов было исследовано 137 проб (от 96 детей, 41 взрослого), норовирусов – 28 проб (все получены от детей), энтеровирусов – 137 проб (от 96 детей, 41 взрослого).

Детекцию АГ рота- и энтеровирусов проводили с использованием коммерческих наборов «Тест-системы иммуноферментной для выявления антигенов ротавирусов у людей и животных РОТА-АГ», Norovirus Ag ELISA (DRG International Inc., USA) и «Тест-система для определения антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь).

Для выделения РНК из проб клинического материала применяли коммерческие наборы «РНК-СОБ» («АмплиСенс», Россия) и TRI Reagent (SIGMA, США) в соответствии с инструкциями производителей.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции RevertAid, включающего обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони, производителя «Fermentas» (Литва). Для инициации реакции обратной транскрипции использовали random-праймеры (синтетические гексануклеотиды

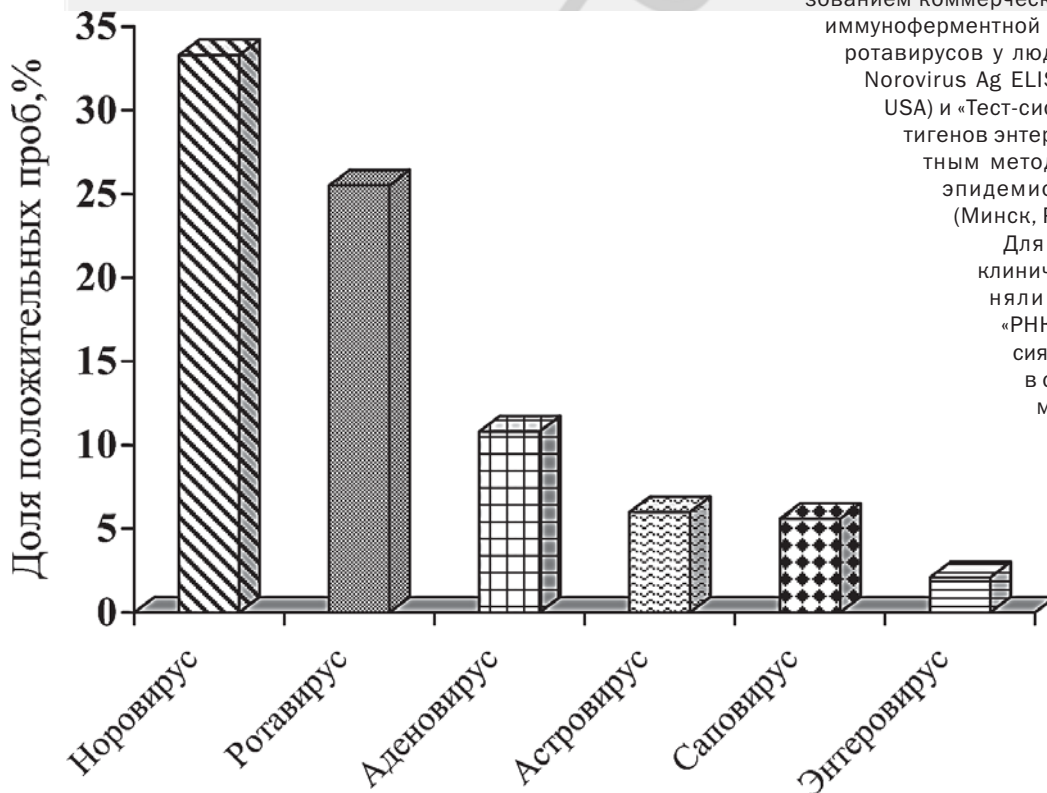


Рисунок 1-Спектр кишечных вирусов, вызвавших ОГЭ у детей и взрослых в 2009-2010 гг

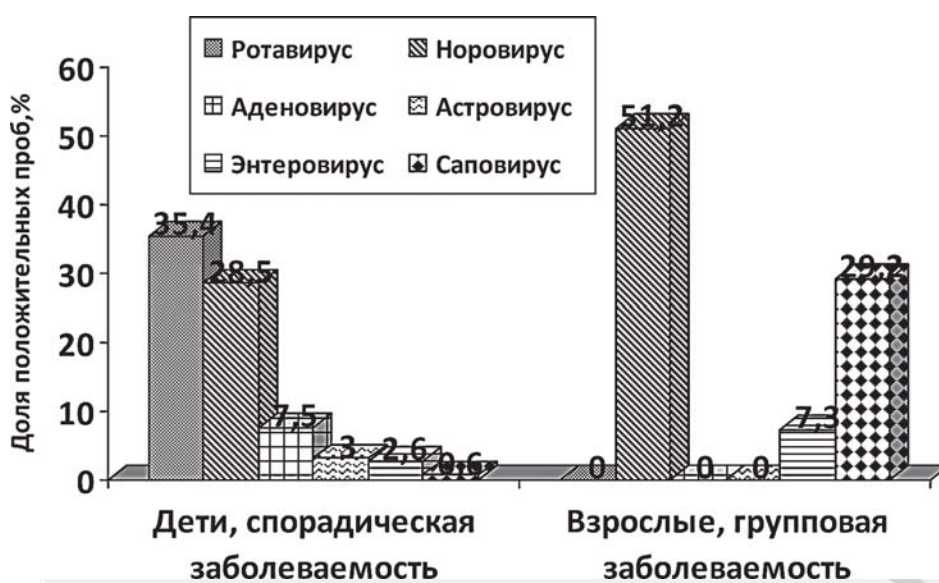


Рисунок 2 – Различия в этиологической структуре у детей и взрослых при спорадической и групповой заболеваемости ОГЭ

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, ротавирусов и ДНК аденовирусов проводили с использованием коммерческих наборов («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Диагностику саповирусов осуществляли в ПЦР с использованием праймеров и условий реакции, разработанных ранее [12]

Результаты и обсуждение

С учетом особенностей существующей в нашей стране лабораторной службы, сложившегося рынка диагностических препаратов и разнообразия потенциальных возбудителей вирусных ОГЭ среди известных экспресс-методов диагностики вирусных инфекций были выбраны иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), направленные на выявление вирусспецифических АГ и нук-

леиновых кислот, соответственно. Каждый из этих методов обладает как определенными преимуществами, так и некоторыми недостатками. К числу преимуществ ИФА следует отнести простоту постановки реакции, более низкие требования к организации рабочих мест и квалификации персонала, широкую оснащенность лабораторий диагностическим оборудованием. В качестве основных недостатков данного метода наиболее часто упоминаются можно отметить более низкую, по сравнению с ПЦР, чувствительность метода и возможность неспецифических взаимодействий, приводящих к ложноположительным результатам реакции. Более высокая чувствительность и низкая вероятность неспецифических взаимодействий являются безусловными достоинствами ПЦР по сравнению с ИФА. Однако широкое распространение ПЦР ог-

раничивается значительно более высокими требованиями к организации рабочих мест, квалификации персонала и высокой стоимостью необходимого оборудования. Следует отметить, что преимущества и недостатки того или иного метода оценивались нами, в том числе, исходя из существующих возможностей индикации конкретного возбудителя в применении к конкретным диагностическим препаратам, представленным на отечественном рынке. Среди последних в качестве диагностических тест-систем были выбраны тест-системы для ПЦР диагностики производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Российской Федерации, а также тест-системы для выявления антигенов кишечных вирусов методом ИФА, которые выпускает РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь). Данные диагностические препараты были апробированы нами в полевых условиях в процессе установления этиологии ОГЭ у детей, находящихся на стационарном лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», а также при расшифровке 4-х эпизодов групповой заболеваемости ОКИ среди взрослых в закрытых коллективах.

Таблица 1. Схема лабораторной диагностики вирусных гастроэнтеритов

		Спорадическая заболеваемость				Групповая заболеваемость			
		Май - октябрь		Ноябрь - апрель		Май - октябрь		Ноябрь - апрель	
		Возбудитель	Метод(ы)	Возбудитель	Метод(ы)	Возбудитель	Метод(ы)	Возбудитель	Метод(ы)
Дети	Старше 3х лет	Аденовирус Энтеровирус Ротавирус Норовирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР	Норовирус Ротавирус Аденовирус	ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус Энтеровирус Аденовирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус Аденовирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР
	До 3х лет	Аденовирус Энтеровирус Ротавирус Норовирус Астровирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА ПЦР ПЦР	Ротавирус Норовирус Аденовирус Астровирус	ИФА ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР	Ротавирус Норовирус Энтеровирус Аденовирус Астровирус	ИФА ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР	Ротавирус Норовирус Астровирус Аденовирус	ИФА ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР
Взрослые	18 – 60 лет	Аденовирус Энтеровирус Норовирус Ротавирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус Аденовирус	ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус Энтеровирус	ИФА/ПЦР ИФА ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР
	Старше 60 лет	Аденовирус Энтеровирус Норовирус Ротавирус Астровирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР	Ротавирус Норовирус Аденовирус Астровирус	ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР	Норовирус Ротавирус Аденовирус Астровирус Энтеровирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР	Норовирус Ротавирус Астровирус Аденовирус	ИФА/ПЦР ИФА/ПЦР ПЦР ИФА/ПЦР

Проведение полевых испытаний для оценки эффективности различных методов лабораторной диагностики ОГЭ позволило установить спектр вирусов, являющихся доминирующими агентами гастроэнтерита в нашей стране. Полученные результаты представлены на рис.1. Из представленных данных видно, что в спектр вирусов, обнаруженных у больных ОГЭ вошли рота-, норо-, адено-, астро-, энтеро- и саповирусы.

Обнаружены существенные различия в типовом разнообразии вирусов, вызвавших ОГЭ у детей в период спорадической и у взрослых, во время групповой заболеваемости (рис. 2). Спектр вирусов, являвшихся этиологическими агентами ОГЭ у детей в периоды спорадической заболеваемости был значительно шире и включал все исследованные группы вирусов – рота-, норо-, астро-, адено-, энтеро- и саповирусы. Наиболее часто выявлялись рота-(35,4%) и норовирусы (28,5%). У взрослых спектр кишечных вирусов, обнаруживаемых во время вспышек ОГЭ, был представлен только норо-, сапо- и энтеровирусами. При этом частота их выявления была значительно выше, чем у детей: норовирусы – в 51,2% проб (28,5%-у детей), саповирусы – в 29,2% проб (0,6%-у детей), энтеровирусы – в 7,3% проб (2,9%-у детей).

Основываясь на результатах проведенных исследований по установлению спектра кишечных вирусов, присутствующих в образцах клинического материала больных ОГЭ, а также эффективности различных методов их диагностики и принимая во внимание имеющиеся на сегодняшний день данные литературы, была разработана схема лабораторной диагностики вирусных ОГЭ у детей и взрослых (Табл. 1.), в зависимости от возраста, вида регистрируемой заболеваемости (групповая, спорадическая) и сезона. Приоритетность проведения лабораторной диагностики в отношении отдельных типов вирусов соответствует порядку, в котором они перечислены в таблице.

Несмотря на то, что наши данные указывают на значительный вклад саповирусов в групповую заболеваемость ОГЭ у взрослых, диагностика этой группы вирусов не включена в разработанную схему в связи с отсутствием зарегистрированных диагностических препаратов. Диагностика саповирусной инфекции будет осуществляться на заключительном этапе, после получения отрицательного результата в отношении других групп кишечных вирусов на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

В качестве основных методов диагностики указаны ИФА для выявления антигенов кишечных вирусов и ПЦР. ПЦР является основным методом диагностики всех групп вирусов, за исключением ротавируса. Если учреждение не располагает возможностями для проведения ПЦР, диагностику можно осуществлять методом ИФА (если этот метод указан в схеме для данного типа вируса). При наличии коммерческих наборов для осуществления хроматографического экспресс-теста, этот метод может быть использован в качестве равноценной замены методу ИФА.

Получение положительного результата лабораторной диагностики методом ИФА в отношении рота- и аденовирусов 40, 41 типов является достаточным для признания обнаруженного типа вируса этиологическим агентом гастроэнтерита.

Положительный результат лабораторной диагностики методом ИФА по выявлению антигенов вируса в отношении норо- и астровирусов должен быть (по возможности) подтвержден методом ПЦР. При невозможности лабораторного подтверждения положительный результат ИФА является достаточным для признания обнаруженного типа вируса этиологическим агентом гастроэнтерита.

Получение положительного результата лабораторной диагностики в отношении энтеро- и аденовирусов, не принадлежащих к виду *Human Adenovirus F* не является достаточным основанием для признания соответствующего типа ви-

руса этиологическим агентом гастроэнтерита. Результаты должны быть дополнены исследованиями по выделению вируса в культуре клеток и установлению его серотипа в реакции нейтрализации, или с помощью молекулярного типирования. В случае получения информации о серотипе, для которого характерно течение заболевания, сопровождающееся симптомами гастроэнтерита, данный серотип может быть признан этиологическим агентом заболевания. Кроме того, регулярное выделение энтеро-, или аденовируса одного типа от сходных случаев заболеваний и от клинически здоровых лиц из окружения больных в совокупности с гомотипичной иммунологической реакцией является веским доказательством этиологической роли соответствующего агента.

При получении отрицательного результата исследований методом ИФА по выявлению антигенов в отношении рота-, норо-, астро-, аденовирусов 40, 41 типов, проба должна быть исследована на тот же спектр вирусов методом ПЦР. При получении отрицательного результата лабораторной диагностики методом ПЦР в отношении всех групп кишечных вирусов, клинический материал должен быть передан в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии для лабораторной диагностики и установления этиологического агента заболевания.

Представленный в настоящей работе положительный опыт идентификации вирусных возбудителей ОГЭ неустановленной этиологии дает основания рекомендовать разработанную тактику и созданную схему дифференциальной диагностики этой группы социально значимых инфекций для широкого использования отечественной лабораторной службой. Существенную помощь во внедрение данных диагностических исследований в целом по стране окажет разработанная и утвержденная в конце 2010 г. инструкция по применению лабораторной диагностики вирусных кишечных инфекций, регламентирующая порядок и методы анализа клинического материала, а также создание в недалекой перспективе конкурентоспособных отечественных диагностических препаратов.

Литература

1. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2008 г».
2. Петрова М.С., Попова О.П., Заикин В.Л., и др. Клиническая характеристика норовирусной инфекции у детей в сб. «Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины» / Материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова. – СПб., ВМедА. – 2006. – 340с.
3. Bates PR, Bailey AS, Wood DJ et al Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus and astrovirus gastroenteritis in children. // J Med Virol. 1993;39(3):224-8.
4. Bern C, 1994
5. Goodgame RW. Viral causes of diarrhea // Gastroenterol Clin North Am. – 2001. – V. 30. – P. 779-795
6. Fankhauser RL., Noel JS., Monroe SS et al. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States // J Infect Dis. – 1998. – V. 178. – P. 1571 – 1578
7. Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC e.a. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 1985. – V.50. – P. 261-264
8. LeBaron Ch., Furutan N., Lew J. et al. Viral Agents of Gastroenteritis: Public Health Importance and Outbreak Management //MMWR. – 1990. – V.39. – P. 1-24
9. Lopman B, Reacher M, van Duynhoven Y et al Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995 – 2000 //Emerg Infect Dis, 2003.-V. 9, No. 1. – P.90-96
10. Snyder JD. Bull WHO, 1982
11. Wilhelmi I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis // Clin. Microbiol. Infect. 2003. – V.9. – P. 247 – 262
12. Yan H., Yagyu F., Okitsu S. et al. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR // J Virol Met. – 2003. – V. 114. – P. 37-44