

# Генодиагностика острых респираторных вирусных инфекций у детей

Е.Н.Кожевникова, А.А.Мухина, Г.А.Шипулин, Н.Н.Мазуник, А.В.Горелов

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В работе установлена этиологическая структура ОРВИ у детей разного возраста на основании нового метода генодиагностики – полимеразной цепной реакции. Диагностировались 6 различных респираторных вирусов: адено-, корона-, рино-, РС-, парагриппа и гриппа за 2 различных эпидсезона. В этиологической структуре преобладали РС- или вирусы гриппа.

**Ключевые слова:** дети, респираторные вирусы, генодиагностика, полимеразная цепная реакция

## Genetic diagnosis of acute respiratory viral infections in children

E.N.Kozhevnikova, A.A.Mukhina, G.A.Shipulin, N.N.Mazunik, A.V.Gorelov

Central Research Institute of Epidemiology, Federal Inspection Service for Protection of Consumer Rights, Moscow

The authors determined the etiological structure of ARVI in children of various age based on a new method of genetic diagnosis, polymerase chain reaction. Six different respiratory viruses, namely, adeno-, corona-, rhino-, RS-, parainfluenza and influenza viruses were diagnosed for 2 different epidemic seasons. In the etiological structure, the RS or influenza viruses prevailed.

**Key words:** children, respiratory viruses, genetic diagnosis, polymerase chain reaction

**В**ирусные инфекции на сегодняшний день преобладают среди всех инфекционных заболеваний, и 90% из них приходится на долю гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [1]. Проблема острых респираторных инфекций отнесена ВОЗ к приоритетным проблемам медицины. Она затрагивает интересы служб здравоохранения во всех странах мира, в том числе и в нашей стране. Острые респираторные заболевания стоят в одном ряду с такими известными «болезнями века», как сердечно-сосудистые, онкологические заболевания и СПИД, занимая одну из доминирующих позиций в структуре инфекционной патологии [2]. Причиной ОРВИ у людей могут быть различные вирусы: представители 4 семейств РНК-содержащих вирусов (ортомиксо-, парамиксо-, корона- и пикорнавирусы) и 2 семейств ДНК-содержащих вирусов (адено- и герпесвирусы) [3]. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что ранняя этиологическая диагностика острых респираторных инфекций необходима для проведения рациональной этиотропной терапии, прогнозирования тяжести заболевания, предотвращения внутрибольничного заражения и сокращения сроков госпитализации. Сходство клинических проявлений, вызываемых различными респираторными вирусами, отсутствие патогномичных симптомов не позволяют проводить этиологическую диагностику заболевания без лабораторных ис-

следований [3, 4]. Этиологическая расшифровка ОРВИ существенно различается по разным источникам. Данные, опубликованные в зарубежной литературе, приведены в таблице [5].

Анализ данных заболеваемости острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) в Российской Федерации за период с 1998 по 2000 г., показал, что основной удельный вес среди респираторных инфекций имеют ОРВИ неустановленной этиологии (ОРВИНЭ) [6]. На основании данных анализа заболеваемости ОРЗ среди детей в Москве за период с 1981 по 1999 г. ( $n = 56\ 287$ ) установлено, что в этиологической структуре также преобладают (89%) ОРВИНЭ (МИФ) [7]. При использовании методов генодиагностики (полимеразная цепная реакция – ПЦР) для расшифровки ОРВИ, удалось установить этиологию в 35% ( $n = 1118$ ) и 34,7% ( $n = 129$ ) случаев [8, 9]. Данные НИИ гриппа РАМН абсолютно противоположны: процент расшифровки проб составляет 82,2–81,7 ( $n = 169$ ) (метод иммунофлюоресценции – МИФ) [10]. При подобном расхождении результатов исследований нельзя получить достоверных данных о распространенности различных вирусов на территории России без выяснения причин их возникновения. Отчасти это может быть связано с применением авторами различных методик.

Методы, применяемые до сих пор, имеют ряд недостатков: вирусологический – длительный и дорогостоящий, требует жестких условий получения материала и его транспортировки [11–13], иммунофлюоресцентный – субъективный, требует хороших навыков персонала, часто дает ложноположительные результаты по сравнению с культуральными методиками [14–16], иммуноферментный (на обнаружение антигенов) – нестабильный, дает большой разброс показате-

### Для корреспонденции:

Кожевникова Елена Николаевна, аспирант детского клинического отделения Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А  
Телефон: (495) 182-0992

Статья поступила 21.05.2005 г., принята к печати 10.10.2005 г.

Таблица. Эффективность расшифровки этиологии ОРЗ

% расшифровки	Общее число пациентов	Возраст пациентов, годы	Метод	Годы	Страна
22,0	736	0-5	Ag, Cl	1986-1989	Индия
29,0	12 354	0-20	Ag, Ab, Cl	1990-1994	Сингапур
32,9	6986	0-12	Cl	1997-1999	Тайвань
35,0	1052	0-5	Ag, Cl	1984-1986	Бразилия
35,6	1029	0-65	Ab, Cl	1991-1995	США
36,1	962	0-65	Ag, Cl	1994-1995	Франция
37,4	5474	0-25	Ab, Cl	1976-1986	Чехословакия
41,3	707	0-5	Ag, Cl	1987-1989	Бразилия
45,0	596	0-5	Ag, Ab, Cl	1986-1987	Таиланд
45,9	804	0-12	Ag, Cl	1990-1994	Корея

Ag – прямые методы детекции;  
 Ab – серологические методы;  
 Cl – культуральные методы. Детектируемые вирусы: гриппа, парагриппа, респираторно-синцициальных, корона-, адено-, герпес- и энтеровирусы.

лей специфичности и чувствительности метода [17–19], иммуноферментный (на обнаружение антител) и другие серологические методы применяются только для ретроспективной диагностики и определения напряженности иммунитета [20]. Благодаря развитию методов генодиагностики (ПЦР) значительно сократились сроки и возросло качество диагностики респираторных вирусов [21–23].

**Целью** настоящей работы являлось уточнение этиологии ОРВИ у детей с помощью ПЦР и определение ее эффективности по сравнению с другими методами диагностики данной группы заболеваний.

### Пациенты и методы

**Обследованы:** 526 детей в возрасте от 1 мес до 14 лет с симптоматикой ОРЗ в остром периоде заболевания. Все дети находились на стационарном лечении в детской инфекционной больнице №5 (ДИБ №5) и клинической инфекционной больнице №1 (ИКБ №1) Москвы с ноября по февраль 2001–2002 гг. и с октября по апрель 2002–2003 гг. по поводу ОРЗ. Среди всех пациентов детей до 1 года было 36,3%, от 1 года до 3 лет – 38,5% и старше 3 лет – 25,2%.

Группу сравнения составили 107 детей аналогичного возраста без катаральных явлений, находившихся на лечении в других отделениях ДИБ №5 по поводу острых кишечных инфекций и острых вирусных гепатитов в тот же период (2001–2002), и 53 здоровых ребенка дошкольного возраста из детского сада №52 Одинцовского района Московской области (2002–2003).

Материал для исследования – мазки из полости носа (нижний носовой ход, наружная стенка носа) и ротоглотки (небные миндалины, передние дужки, задняя стенка глотки), забираемые одноразовыми зондами с ватными тампонами. После взятия материала зонды из полости носа и ротоглотки помещали в стерильную пробирку, содержащую 500 мкл транспортной среды (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). До проведения исследования пробирки замораживали и хранили при –70°C.

Клинический материал, полученный от пациентов, тестировался методом ПЦР на наличие респираторно-синцициальных (РС) вирусов группы А и Б, вирусов гриппа А и В, вирусов парагриппа человека типов 1, 2, 3, и 4, риновирусов, коронавирусов антигенных типов 1 и 2, аденовирусов. Для

выделения РНК и ДНК возбудителей из клинических проб применялся набор «Рибосорб» производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Для проведения реакции обратной транскрипции использовался набор «Реверта» того же производителя. Амплификацию специфических нуклеотидных последовательностей агентов, вызывающих ОРВИ, проводили с использованием наборов олигонуклеотидных праймеров и методик, разработанных в ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора [16]. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Результаты скринингового тестирования клинического материала с помощью ПЦР-методики сравнивались с результатами, полученными при рутинном использовании реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ) с поликлональными антителами, которая проводилась на лабораторной базе ДИБ №5 и ИКБ №1 с использованием реагентов производства НИИ гриппа РАМН, согласно инструкции производителя [14]. Образцы для проведения ПЦР отбирались в тот же день, что и для РПИФ (в первые 36 ч с момента поступления).

Для определения эффективности метода ПЦР проводили параллельное определение антигенов РС-вирусов в мазках методом РПИФ с моноклональными антителами фирмы DAKO Image (США).

### Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные при тестировании клинического материала от 526 пациентов методом ПЦР, представлены на рис. 1. В сезонный подъем заболеваемости ОРВИ 2001–2002 гг. в этиологической структуре ОРВИ у госпитализированных детей преобладали РС-вирусы (рис. 2а). На втором месте по частоте обнаружения были аденовирусы. Третьим по значимости этиологическим агентом был вирус гриппа (в этом году заболеваемость гриппом в городе не превышала эпидемического порога). Риновирусы и коронавирусы выделялись нами с одинаковой частотой у 1% больных. Наиболее редко встречались вирусы парагриппа.

В период сезонного подъема заболеваемости респираторными инфекциями в 2002–2003 гг. этиологическая струк-

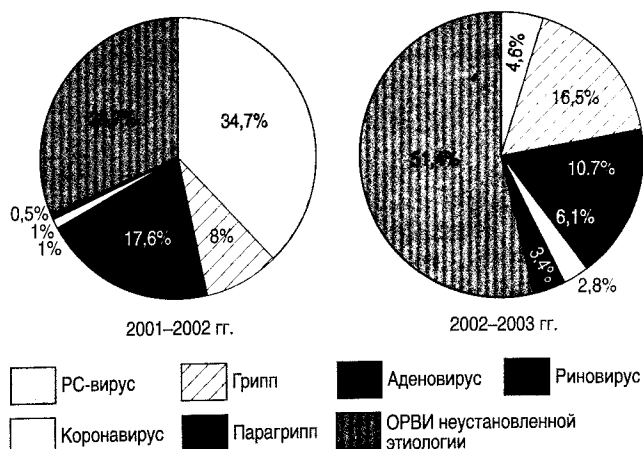


Рис. 1. Этиологическая структура ОРВИ за 2001–2002 и 2002–2003 гг.

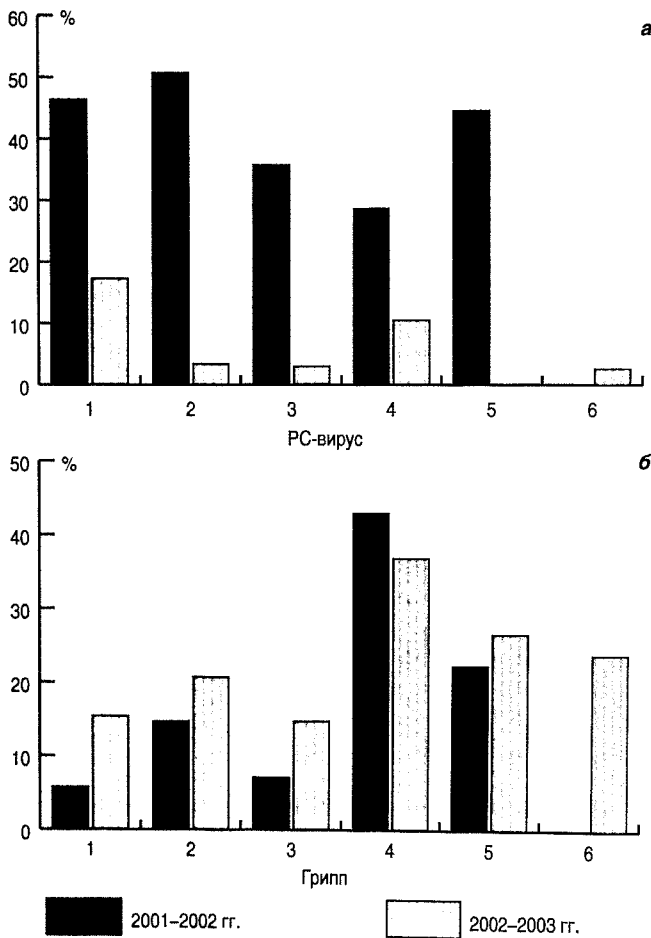


Рис. 2. Частота встречаемости РС-вирусов (а) и вирусов гриппа (б) в разных возрастных группах в 2001–2002 гг. и 2002–2003 гг. 1 – дети до 1 года; 2 – от 1 года до 3 лет; 3 – 3–5 лет; 4 – 5–7 лет; 5 – 7–10 лет; 6 – 10–14 лет.

тура ОРВИ была иной. Доминирующие позиции среди этиологических агентов занимали вирусы гриппа, что полностью соответствует ситуации в стране в целом (рис. 2б). На втором месте по частоте обнаружения стояли аденовирусы. Третьим наиболее значимым этиологическим агентом ОРЗ в эти годы были риновирусы. Вклад РС-вирусов в заболеваемость ОРВИ в этом сезоне значительно уменьшился и составил лишь 4,6%. Наиболее редко обнаруживались вирусы парагриппа и коронавируса.

Частота встречаемости различных возбудителей ОРВИ в значительной степени зависела от возраста пациентов (рис. 3). Так, в 2001–2002 гг. в возрастной группе детей до 1 года жизни и 1–3 лет по частоте обнаружения лидировали РС-вирусы, в группах детей более старшего возраста – аденовирусы и грипп. В 2002–2003 гг. в силу эпидемической ситуации по гриппу РС-вирусы преобладали только в возрастной группе детей до 1 года жизни, а уже начиная с 1 года жизни, дети болели преимущественно гриппозной инфекцией. Среди РС-вирусов преобладали вирусы типа А (90%), что соответствует данным литературы о превалировании РС-вирусов типа А [15]. Среди вирусов гриппа в 2001–2002 гг. доля вирусов гриппа типа А составила 68,4%, вирусов гриппа типа В – 31,6%, что совпадает с данными НИИ гриппа РАМН

о преобладании в г. Москве циркуляции штаммов гриппа А над штаммами гриппа В (по результатам вирусологического исследования) [24]. В 2002–2003 гг. подобное соотношение сохранялось. Коронавирусы обнаруживались в небольшом (0,9–1,5) проценте случаев у детей до 1 года в 2001–2002 гг. и у детей до 5 лет в 2002–2003 гг. По данным литературы, чаще эта инфекция встречается у детей младшего возраста, нами выявлено нехарактерное повышение (0,6%) заболеваемости данной инфекцией среди детей 10–14 лет в 2002–2003 гг. Вероятно, это объясняется тем, что 2003 г. был эпидемичным для данного вируса [25]. Преимущественно (66,7–67,3%) обнаруживались коронавирусы типа ОС-43. Риновирусная инфекция была представлена в небольшом (0,3–2,8) проценте случаев во всех возрастных группах в течение 2 лет. Это объясняется тем, что проводилось скрининговое обследование всех поступающих в стационар детей с ОРВИ, а по данным литературы, в гораздо большем проценте случаев риновирусы выявляются у лиц с хронической патологией легочной системы и иммуносупрессивных пациентов [9, 26]. Вирусы парагриппа выявлялись у детей до 1 года жизни в 2001–2002 гг. (0,5%) и до 5 лет в 2002–2003 гг. (0,3–1,8%), причем в 2001–2002 гг. нами выявлена циркуляция только вируса парагриппа типа 4, а в 2002–2003 гг. встречались все 4 типа вируса в разном соотношении. Подобная частота встречаемости, по данным зарубежной литературы, вполне обоснована, так как только при исследовании вспышечной заболеваемости можно получить более высокий процент выявления данных вирусов [8, 12, 27].

Обращает на себя внимание тот факт, что наряду с моновирусными заболеваниями мы фиксировали и вирусные микст-инфекции, доля которых в 2001–2002 гг. составила 9%, в 2002–2003 гг. – 4,5%. Наиболее часто одновременно встречались вирусы гриппа и аденовирусы, так как аденовирусы способны длительно персистировать, и методом ПЦР нельзя различить острую аденовирусную инфекцию и носительство. В результате проведенного исследования этиологическую природу ОРВИ удалось установить у 72,3% пациентов в 2001–2002 гг. и у 48,6% в 2002–2003 гг., что соответствует результатам аналогичных исследований, проведенных за рубежом [3, 5].

При обследовании 107 детей из группы сравнения в 2001–2002 гг. аденовирусы были обнаружены у 16 (15%) человек, РС-вирусы типа А – у 1 (0,9%). В 2002–2003 гг. из 53 детей группы сравнения у 2 (5,8%) детей выявлены аденовирусы. Других респираторных вирусов в группе сравнения обнаружено не было.

Сравнение эффективности диагностики вирусной природы ОРВИ методами ПЦР и рутинной РПИФ проводилось в равноценных группах детей (по 84 человека), госпитализированных в ДИБ №5 в 2001–2002 гг. и в ИКБ №1 в 2002–2003 гг. По данным ДИБ №5 (РПИФ), у больных чаще обнаруживались вирусы парагриппа (21,4%), затем РС-вирусы (14,2%), вирусы гриппа были выявлены у 2,3% детей, аденовирусная инфекция у 1% пациентов. В большинстве случаев (61,9%) этиологию ОРЗ установить не удалось. По данным ИКБ №1 (РПИФ), у больных при обследовании лидировали аденовирусы (11,9%), немного реже выявлялись вирусы гриппа (10,7%), достаточно редко – вирусы парагриппа и РС-вирусы (4 и 3,6%). У 4,8% пациентов обнаруживалась

Генодиагностика острых респираторных вирусных инфекций у детей

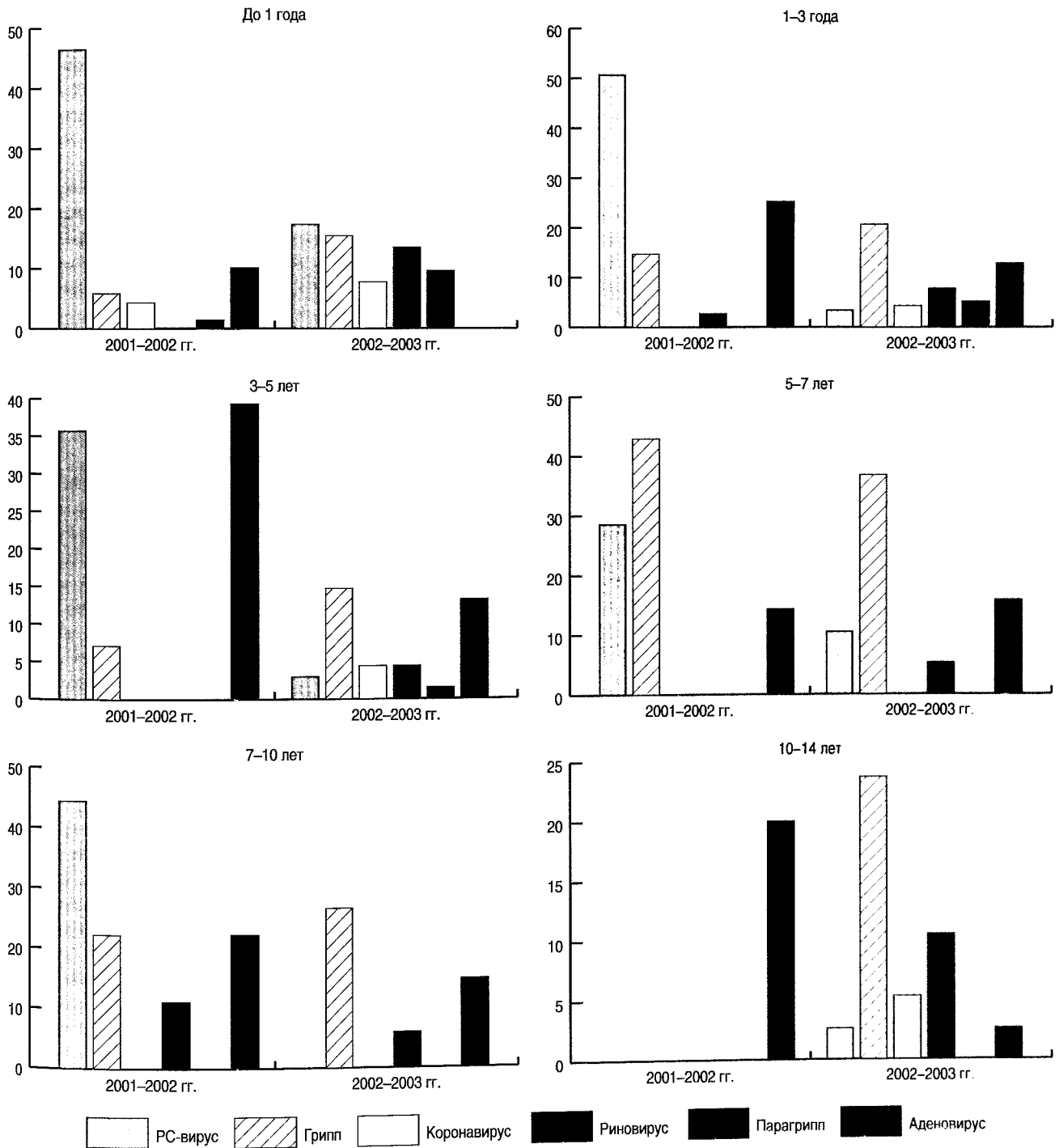


Рис. 3. Возрастные особенности этиологической структуры ОРВИ у детей.

микст-инфекция. Группа ОРВИ неустановленной этиологии составила 61,7%. При сопоставлении данных ПЦР и РПИФ по отдельным инфекциям наблюдалось полное расхождение результатов 2 методик.

Это заставило нас провести сравнительное изучение эффективности ПЦР и РПИФ для диагностики ОРВИ у детей по отношению к другому методу, обладающему высокими показателями чувствительности и специфичности. У 10 больных было проведено параллельное определение антигенов РС-вирусов (дающих наиболее часто дискордантные резуль-

таты по 2 методикам) в мазках 3 методами. В качестве «золотого стандарта» выбрана РПИФ с моноклональными антителами производства DAKO Imagen (США), показатели чувствительности и специфичности которой составляют 89,6 и 96,7% (по сравнению с вирусологическими методиками). Методика использовалась в Центральном НИИ эпидемиологии согласно инструкции производителя. Получены следующие результаты. Из 10 исследованных проб методом DAKO выявлено 9 положительных проб, РПИФ – только 4, а ПЦР – 10 проб, отрицательных – в DAKO только 1 проба, РПИФ вы-

явила 6 проб (из них в 2 пробах обнаружен антиген парагриппа). 1 «ложноположительную» пробу, выявленную методом ПЦР, можно объяснить более высокой чувствительностью методики. Эти данные демонстрируют большой процент совпадения результатов ДАКО с ПЦР по сравнению с РПИФ.

### Заключение

С помощью разработанной оригинальной методики установлена частота встречаемости респираторных вирусов у детей с ОРЗ в г. Москве в период эпидемического подъема заболеваемости. Выявлено, что этиологическая структура ОРВИ в разные эпидемические сезоны различается и зависит от возраста обследуемого контингента.

Получены убедительные доказательства превалирования вирусов гриппа и РС-вирусов с доминированием одного из них в структуре ОРВИ у детей, госпитализированных в стационары Москвы. В период эпидемического подъема заболеваемости гриппом, сопровождающегося преодолением эпидемического порога заболеваемости, доля других респираторных вирусов в этиологической структуре ОРЗ значительно снижается, в то время как при спорадической заболеваемости гриппом превалируют другие вирусы, в частности, РС-вирус, что отмечалось нами в 2001–2002 гг. и подтверждено многочисленными зарубежными исследованиями [8, 12].

Сходные данные о частоте обнаружения аденовирусов в мазках от больных ОРВИ детей и в группе сравнения могут затруднять интерпретацию полученных нами результатов лабораторных исследований. В этой ситуации нельзя с уверенностью говорить о роли данных вирусов в возникновении симптомов заболевания без анализа клинической картины болезни и дополнительных лабораторных исследований.

Обнаружение РС-вируса в мазках у 1 ребенка без катаральных явлений говорит о возможном формировании длительного носительства данного вируса после перенесенного заболевания или об обнаружении вируса в инкубационном периоде.

РПИФ с поликлональными антителами, чаще всего используемая на практике для рутинной диагностики ОРВИ в стационарах, обладает низкой чувствительностью и специфичностью и дает большое количество как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

Использованные нами ПЦР-методики для определения различных респираторных вирусов в мазках со слизистой ротоглотки и носоглотки позволили быстро и качественно проводить этиологическую диагностику ОРВИ, что делает возможным считать ее методом выбора для этой группы заболеваний.

### Литература

- Шарапова О.В. Проблемы инфекционной заболеваемости в России в новом тысячелетии. *Детские инфекции* 2004; 1: 4–5.
- Камышенцев М.В., Стефанов В.Е. Грипп: путь решения проблемы. СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2002; 6.
- Lina B., Valette M., Foray S., et al. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during Winter 1994–1995. *J Clin Microbiol* 1996; 3007–11.
- Stockton J., Ellis J., Savill M., et al. Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and Respiratory Syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 2990–95.
- Huey-Pin Tsai et al. Respiratory Viral Infections among Pediatric Inpatients and Outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 111–8.
- Семенов Б.Ф., Гервазиева В.Б., Сверановская В.В. Распространенность и структура ОРВИ. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2002; 5: 78–84.
- Горбунов С.Г., Горелов А.В., Косоротикова А.И. Этиологическая структура ОРВИ у детей, госпитализированных в стационар за 1981–1999 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2001; (6): 25–7.
- Grondahl B., Puppe W., Hoppe A., et al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 1–7. 5.
- Хайтов М.П. Молекулярно-генетический и иммунологический анализ роли респираторных вирусов в этиологии и патогенезе астмы. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. 1994.
- Суховецкая В.Ф., Соминина А.А., Дриневский В.П. и др. Клиника и диагностика острых стенозирующих ларинготрахеобронхитов у детей при ОРВИ различной этиологии. *Детские инфекции*. 2004; 1: 10–5.
- Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика. Пособие для врачей. М.: МЗ РФ, Союз педиатров России, международный фонд охраны здоровья матери и ребенка. 2002; 70
- Lioliou L., Jenney A., Spelman D. et al. Comparison of a multiplex Reverse Transcription-PCR-Enzyme Hybridization Assay with Conventional Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for the Detection of seven viral Respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 2001; 2779–83.
- Eugene-Ruellan G., Freymuth F., Banloul C., et al. Detection of RSV A and B and PIV 3 sequences in respiratory tract of infants by single PCR with primers targeted to L-Polymerase gene and differential hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 796–801.
- Приказ № 101/46 от 19 апреля 1995 года «О защите населения от гриппа и других ОРЗ». Министерство здравоохранения и медицинской промышленности РФ и ЦГСЭН РФ.
- Irmen K., Kelleher J. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses in a community hospital. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 396–403.
- Мухина А.А., Шипулин Г.А., Кожевникова Е.Н. и др. ПЦР-диагностика респираторных вирусных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2002; 6: 51–5.
- Pregliasco F., Puzelli S., Mensi C. Influenza virological surveillance in children: the use of the QuickVue rapid diagnostic test. *J Med Vir* 2004; 73: 269–73.
- Myers D. The RSV TestPack EIA does not help clinical decision-making for children with possible RSV. Evidence-Based pediatrics site of University of Michigan Health System. <http://www.med.umich.edu>, 1999.
- Falsey A., Walsh E. RSV infection in adults. *J Clin Microbiol Rev* 2000; 371–84.
- Карпунин Г.И., Карпухина О.Г. Диагностика, профилактика и лечение ОРЗ. СПб.: Гиппократ, 2000.
- Carroll K.C. Minireview: Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *J Clin Microbiol* 2002; 3115–20.
- Hu A., Colella M., Tam J., et al. Simultaneous Detection, subgrouping, and quantitation of RSV A and B by Real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 149–54.
- Andeweg A., Bestebroer T., Huybregts M., et al. Improved detection of Rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed Nested RT-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 524–30.
- Соминина А.А., Маринич И.Г., Киселев О.И. и др. Мониторинг гриппа в России за 2001–2002 год. НИИ гриппа РАМН. Российский национальный центр ВОЗ по изучению гриппа, федеральный центр по изучению гриппа и других ОРЗ. СПб., 2002.
- Мурадян А.А., Осидак Л.В., Румель Н.Б. и др. Значимость коронавирусной инфекции в острой респираторной патологии у детей. *Детские инфекции* 2003; 3: 22–5.
- Nicholson K., Kent J., Hammersley V., et al. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective population based study of diseases burden. *BMJ* 1997; 315: 1060–4.
- Henrickson K. Parainfluenza viruses. *J Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2): 242–64.