

пи на наружных половых органах. Элементы сыпи полиморфны — встречаются везикулы, пустулы, поверхностные болезненные эрозии. Заболевание может рецидивировать. В соскобе поражения могут быть обнаружены многоядерные гигантские клетки и вирусные включения. Для подтверждения диагноза используют методы выделения (обнаружения) вируса на культуре тканей и серологические реакции (РСК, реакция нейтрализации). Диагностическим считается нарастание титра антител не менее чем в 4 раза. Наличие положительной реакции без динамики титров можно выявить у многих здоровых людей (за счет латентной герпетической инфекции).

При проведении дифференциальной диагностики пахового лимфаденита при ИПППП приходится учитывать, что эти ЛУ могут изменяться не только при инфекционных заболеваниях, но и при других болезнях: гнойном лимфадените, опухолевом поражении ЛУ (лимфомы, лимфосаркомы, метастазы опухолей, лимфогранулематоз) [2, 9].

Среди лимфаденопатий неинфекционного генеза необходимо иметь в виду болезни лимфолипролиферативного ряда и злокачественные новообразования со своеобразным распространением метастазов, свойственным разным опухолям в зависимости от их клеточного состава и локализации.

**Гнойный лимфаденит** — чаще вторичное заболевание. Первичным очагом могут быть инфицированные раны, фурункулы и др. Гнойный лимфаденит нередко сопровождается поверхностным и глубоким лимфангитом. ЛУ значительно увеличены, болезненны. Кожа над ними гиперемирована, иногда появляется флюктуация узла. Температура тела повышена, выражена общая интоксикация. В анализе крови: нейтрофильный лейкоцитоз, повышение СОЭ. При посеве гноя (после пункции) выделяются стрептококки, стафилококки.

При опухолевом поражении паховых лимфатических узлов (лимфомы, лимфосаркомы, метастазы опухолей, лимфогранулематоз) отмечается их значительное увеличение. Всегда отсутствует местный воспалительный процесс. Узлы деревянной плотности, малобольные. Кожа над узлами не изменена.

При лимфоме и лимфогранулематозе повышается температура тела, но повышение ее даже до 39°C больные переносят сравнительно легко.

При опухолевом поражении ЛУ, лимфоме, лимфогранулематозе (в данном случае паховом) не наблюдается нагноения; узлы постепенно увеличиваются в размерах, плотность их нарастает.

Таким образом, основываясь только на клинических и эпидемиологических данных, можно дифференцировать инфекционные болезни, протекающие с синдромом "первичный аффект — регионарный лимфаденит", ИПППП от неинфекционных заболеваний, сопровождающихся паховым лимфаденитом. Необходимо обследование и описание состояния всех ЛУ, включая паховые. Лабораторные исследования часто только подтверждают диагноз.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов Б. П. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней. — М., 2000.
2. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней / Казанцев А. П., Зубик Т. М., Иванов К. С. и др. — М., 1999.
3. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней: Руководство для врачей. — СПб, 2001.
4. Маски инфекционных болезней / Лобзин Ю. В., Финогеев Ю. П., Винакмен Ю. А. и др. — СПб, 2002.
5. Руководство по инфекционным болезням / Под ред. Ю. В. Лобзина, А. П. Казанцева. — СПб, 1996.
6. Самцов А. В. Заразные дерматозы и венерические болезни. Современные методы лечения. — СПб, 1997.
7. Самцов А. В., Барбинов В. В. Кожные и венерические болезни. — СПб, 2002.
8. Шлосберг Д., Шульман И. А. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней: Пер. с англ. — М.; СПб, 1999.
9. Юшук Н. Д., Венгеров Ю. Я. Лекции по инфекционным болезням. — 2-е изд. — М., 1999. — Т. 2.

Поступила 12.11.02

## ОБМЕН ОПЫТОМ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.2-022.6-07:577.2

А. А. Мухина, Г. А. Шипулин, Е. Н. Кожжевникова, В. Н. Кузьмина, А. В. Горелов, И. Л. Обухов

## ПЦР-ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Центральный НИИ эпидемиологии Минздрава РФ, ФГУ ВГНИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, Москва

Среди всего разнообразия вирусов, вызывающих острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), наибольшее значение имеют РНК-содержащие вирус гриппа типов А и В, респираторно-синцитиальный вирус типов А и В (РС-А и РС-В), вирусы парагриппа типов 1—3, а также ДНК-содержащие аденовирусы. Перечисленные вирусы обладают тропностью к нижним отделам дыхательных путей, и заболевания вызванные ими, протекают с развитием бронхитов, бронхиолитов, пневмоний. Данные вирусы обуславливают высокий уровень заболеваемости ОРВИ, а также являются одной из причин смертности у детей раннего возраста, пожилых и лиц с ослабленной иммунной системой. Риновирусы, вирус парагриппа типа 4 вызывают, как правило, легкие респираторные заболевания [13]. Роль коронавирусов типов 1 (229Е) и 2, (ОС43), а также недавно открытых метапневмовирусов в структуре острых респираторных заболеваний (ОРЗ) до сих пор уточняется. По последним данным, метапневмовирус (семейство Paramyxoviridae) вызывает 1,5—10% всех заболеваний нижних дыхательных путей, по клиническим проявлениям сходных с таковыми РС-вирусной природы [8, 16]. Частота обнаружения коронавирусов при острых респираторных заболеваниях верхних дыхательных путей колеблется от 3,5

до 30% и зависит от метода диагностики данной инфекции [11, 13, 15].

Ранняя этиологическая диагностика ОРВИ необходима для проведения рациональной этиотропной терапии, прогнозирования тяжести заболевания, предотвращения внутрибольничного заражения и сокращения сроков госпитализации. Сходство клинических проявлений ОРВИ, отсутствие патогномичных симптомов не позволяют проводить этиологическую диагностику заболевания без лабораторных исследований [3, 4].

Для ранней диагностики респираторных инфекций наиболее часто используют иммунофлюоресцентные методы, которые отличаются простотой и быстротой выполнения, а также доступностью реагентов, но при сравнении с вирусологическими методиками значительно уступают по всем аналитическим показателям [10, 14]. В последнее время за рубежом накоплен положительный опыт генодиагностики респираторных вирусов на основе ПЦР [6, 7, 12]. Высокие аналитические показатели ПЦР-анализа делают его конкурентным иммунофлюоресцентным методикам.

Целью настоящей работы являлось уточнение этиологии с использованием метода ПЦР. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

Таблица 1

Вирусы гриппа, использованные в работе, и подбор температуры отжига праймеров

Вирус и подтип (по базе данных Los Alamos)	ПЦР с праймерами Inf A 1-3 к вирусу гриппа А		ПЦР с праймерами Inf B1,2 к вирусу гриппа В		Мультиплексная ПЦР с праймерами Inf А, В к вирусам гриппа А и В			
	61°C	55°C	61°C	55°C	65°C	63°C	61°C	55°C
А/черноголовый хохотун/Астрахань/1421/79	Нд	-	-	-	-	-	-	сл
А/индюк/Висконсин/1/66	H5N9	+	+	-	-	+	+	+
А/индюк/Онтарио 6118/68	H8N4	+	+	-	-	-	+	+
А/утка/Германия 1215/73	Нд	нсп	нсп	-	-	-	+	+
А/утка/Чехословакия/56	H4N6	-	-	-	-	-	-	-
А/утка/Англия/56	H11N6	+	нсп	-	-	-	+	+
А/утка/Альберта/60/76	H12N5	+	+	-	-	-	+	+
А/утка/Украина/1/63	H3N8	сл	+	-	-	-	-	сл
А/утка/Альберта/35/76	H1N1	+	+	-	-	+	+	+
А/курица/СССР315/70	Нд	-	-	-	-	-	+	+
А/цыпленок/Германия/Н/49	H10N7	-	сл	-	-	+	+	+
А/крячка/Ю. Африка/61	H5N3	+	+	-	-	+	+	+
А/лошадь-2 Произв./Франция/98	Нд	-	-	-	-	-	-	+
А/лошадь-2/Орел/34/70	Нд	-	сл	-	-	-	-	+
А/лошадь-1/Прага/56/56	H7N7	сл	+	-	-	-	-	+
А/лошадь-1/Кэмбридж63	H7N7	сл	+	-	-	-	-	сл
А/лошадь-2/Битца/85	Нд	-	-	-	-	-	-	сл
А/лошадь/Киргизия/74	Нд	-	-	-	-	-	-	+
А/свинья/Айова/15/30	H1N1	+	нсп	-	-	-	сл	сл
А/человек/Москва/10/99	H3N2	+	+	-	-	сл	сл	+
В/человек	Нд	-	-	+	+	-	-	+

Примечание. 55 и 61°C — температура отжига праймеров, нсп — неспецифическое взаимодействие праймеров, сл — слабopоложительный результат, Нд — нет данных.

1. Разработать оригинальную методику ПЦР-диагностики вирусов, наиболее часто вызывающих поражения различных отделов дыхательного тракта.

2. Методом ПЦР определить частоту встречаемости респираторных вирусов при выборочном обследовании детей с ОРЗ и детей без катаральных явлений (контрольная группа).

3. Сравнить частоту обнаружения респираторных вирусов, выявляемых с помощью ПЦР и рутинного метода диагностики ОРВИ — реакции прямой иммунной флюоресценции (РПИФ).

Материалы и методы

**Пациенты.** Исследование проводили в период сезонного подъема заболеваемости ОРВИ. Материалом для исследования служили мазки со слизистых носа и ротоглотки, полученные от 199 детей с симптоматикой ОРЗ в остром периоде заболевания. Все дети находились на стационарном лечении в детской инфекционной больнице (ДИБ) № 5 Москвы в ноябре—феврале 2001—2002 гг. по поводу ОРЗ, осложнений со стороны верхних и нижних дыхательных путей, ЛОР-органов. Дети до года составили 36,3%, от 1 года до 3 лет — 38,5% и старше 3 лет — 25,2%.

В контрольную группу были включены 110 детей аналогичного возраста без катаральных явлений, находившихся на лечении в ДИБ № 5 по поводу инфекционной патологии желудочно-кишечного тракта в тот же период.

**Получение мазков из полости носа и зева для проведения ПЦР-анализа.** Материал из полости носа (нижний носовой ход, наружная стенка носа) и ротоглотки (нёбные миндалины, передние дужки, задняя стенка глотки) брали с помощью одноразовых зондов с ватными тампонами и помещали в отдельные пробирки, содержащие 1 мл транспортной среды (производство НИИ эпидемиологии Минздрава РФ, Москва). После взятия мазков пробирки замораживали и хранили до проведения ПЦР-анализа при -70°C.

**Получение мазков из полости носа для проведения РПИФ.** После предварительной очистки носовых ходов от слизи вращательным движением в нижний носовой ход вводили сухой ватный тампон на глубину 2—3 см от наружного носового отверстия. Затем тампоны помещали в пробирку с фосфатно-солевым буферным раствором, встряхивали и отжимали. Десквамированные эпителиальные клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5—6 мин и полученный осадок

наносили на предметные стекла отдельными каплями для исследования методом РПИФ.

**Штаммы.** В качестве положительного контроля в работе был использован 21 штамм вируса гриппа типа А человека и животных (табл. 1), 1 штамм вируса гриппа В, 1 штамм РС-А, по 1

Таблица 2

Штаммы и ДНК микроорганизмов, потенциально встречающихся в дыхательных путях человека, которые были использованы для проверки специфичности разработанной ПЦР-методики

ДНК человека	Копий/мл
Str. spp.*	10 <sup>6</sup>
St. aureus + saprophiticus	10 <sup>6</sup>
N. spp.***	10 <sup>6</sup>
Klebs + Morax + Proteus + Heam**	10 <sup>6</sup>
Candida albicans	10 <sup>7</sup>
MTB	10 <sup>8</sup>
U. urealiticum	10 <sup>6</sup>
Ch. trahomatis	10 <sup>6</sup>
M. hominis	10 <sup>6</sup>
HSV1	10 <sup>7</sup>
HSV2	10 <sup>8</sup>
VZV	10 <sup>7</sup>
HSV6	10 <sup>7</sup>
CMV	10 <sup>2</sup>
Rubella virus	10 <sup>5</sup>
Measels virus	10 <sup>6</sup>

\* Str. spp. (Mitus, suis, pyogenus, agalacti, viridans, anginosus, salivarius, mutans, pneumonia).

\*\* Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumonia + Moraxella catarrhalis + Proteus Mirabilis + H. haemoliticus, H. parainfluenzae, H. influenzae B.

\*\*\* N. spp. (sicca, flava, subflava, cinerea, mucosa, elongata, gonorrhoea, meningitides A, B, C)

Таблица 3

## Нуклеотидная последовательность праймеров, использованных в работе

	Праймер	Последовательность 5'-3'	Область	Положение	ПЦР-продукт
Риновирусы	Rhino1+	cc agt agt aga cct ggc aga tga ggc t(g/a)g a	5'NCR	302-330 HuRhino 1B NC_001435	*Rhino1 + EV2 = 343 b. p. Rhino1 + Rhino2 = 180
	Rhino2-	gc tgc agg gtt aag gtt agc c(a/g)c att ca		456-482 HuRhino 1B NC_001435	
	Ev2m-	cti tti gtc acc gga tgg cca atc caa		626-653 Coxsakie B6 AF105342	
Коронавирусы типа 1	CorE1+	acc tca tct gtt gta gat ggt gtt gtg agg a	Spike protein	20760-21053 HuCorona 229E NC_002645	293
	CorE2-	g tac caa atg gta tgt gag cat cac ctg aaa			
Коронавирусы типа 2	Cor1+	tgg cat agg tga gca ctg tac ggg tct t	Spike protein	1665-2087 HuCorona OC43 Z32769	422
	Cor2-	tta gca tga aag gcc gct gaa aca cga			
	RSA+	ggg cct ggg aca ctc tct atc at(c/t)tat tat tc	G	4700-4732 RS-A U39662	A-483
РС-вирус	RSB+	gcc ata ata ttc atc atc tct gcc aat ca		4828-4857	B-355
	RS-	a ata tgc tgc agg g(t/a)a c(a/g)a agt tga aca c		5154-5183 RS-A U39662	
	InfA1+	ggg gac tgg tgg gga acg cca gga t	NP	80-105 AF072545	425
Грипп А	InfA2+	t gga aac tga tgg (g/a)ga acg cca gaa t		474-505 AF072545	
	InfA3-	gag ctc ttg ttc tct gat agg tgg cat cgt t			
	InfA4-	gag ctc ttg tcc tct ggt atg ttg tat cat t			
	InfA5-	ag ccc ttg ttc tct g(g/a)t aig tgg cat cat t			
	InfB1-	ggg agc aac caa tgc cac cat aaa ctt	NP		271
Грипп В	InfB2+	atg gct caa acc ctt caa (t/c)tc cag cag at			
	Парагрипп: типа 1	PIV-1-1- cag tct tgt tga aca aga aca gca g(g/a)g atg	HN	359-790 PIV 1 AF016280	430
Парагрипп: типа 2	PIV-1-2+	gat ttc cgg ttg tgc ttg atg tca ta gtg			
	PIV-2-1+	cca ttt acc taa ctg atg gaa tca atc gca	HN	760-895 PIV-2 AF213352	135
Парагрипп: типа 3	PIV-2-2-	ctc agt tca gct aga tca gt(c/t) gtg gca			
	PIV-3-1+	tga aca caa ggc ttc tta caa ttc aga gtc a	HN	7088-7626 PIV-3 HN Z11575	538
Парагрипп: типа 4	PIV-3-2-	act ttg gga gtc gaa cac agt tga tat aca			
	PIV-4-1+	gca eta aaa gaa tta ggt gca acc agt caa	P	125-435 PIV4A M55975	310
	PIV-4-2-	gtc tct tct ttg cat cca gaa tga gtc ct t			
Метапневмовирус	Mack1	agg ata tct cag tgt tct gag gac agg ttg	F	(-4)-142 AF371343	242
	Mack2	gtt tca aca ccg agt gct att gct cc			
	Oster1	gtg agc tgt tcc att ggc agc aat aga gta		2048-2194 AF371367	146
	Oster2	aca tgc tgt tca ccc tca att ttg ctt ag			

**Примечание.** Интерпретация результатов ПЦР с праймерами Rhino1, Rhino2, EV2 проводится следующим образом: если на электрофореграмме присутствует одна полоса на уровне 180 п. о., то считается, что данный образец содержит амплифицированный фрагмент риновируса; одна полоса на уровне 343 п. о. или две полосы на уровне 180 и 343 п. о. одновременно, то считается, что данный образец содержит амплифицированный фрагмент энтеровируса.

штамму вирусов парагриппа типов 1 (Сендай), 2 и 3, аденовирусы серотипов 5, 7, 37 и штаммы энтеровирусов (Coxsackie, B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio 1, 11, 111). Специфичность всех препаратов была подтверждена вирусологическими методами. Перечисленные штаммы были любезно предоставлены ФГУ ВГНИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, а также ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Кроме того, специфичность ПЦР-анализа доказывали на штаммах и препаратах ДНК и РНК вирусов и бактерий, потенциально колонизирующих дыхательные пути человека (табл. 2).

**Праймеры.** Для амплификации кДНК респираторных вирусов были выбраны следующие олигонуклеотиды: для одновременного выявления вирусов гриппа типов А и В в формате мультиплексной ПЦР вырожденные праймеры ограничивали фрагменты гена NP длиной 425 и 271 пар оснований (п. о.) соответственно; для выявления РС-А и РС-В в мультиплексной ПЦР праймеры фланкировали участки гена G размером 483 и 355 п. о. соответственно; для детекции вирусов парагриппа типов 1—4 в мультиплексной ПЦР подобраны праймеры, комплементарные гену HN для типов 1, 2, 3 и гену P для типа 4, при этом длины специфических продуктов составляли 430, 135, 538 и 310 п. о. соответственно типам 1—4. Для раздельного выявления ко-ронавирусов типов 1 и 2 были выбраны праймеры к гену поверхностного белка (spike protein), длины амплифицированных фрагментов составляли 293 и 422 п. о. Так же были выбраны 2

пары праймеров на разные области гена F метапневмовирусов для проведения ПЦР в двух пробирках. Для выявления риновирусов из клинического материала и дифференциации их от энтеровирусов нами предложено 3 праймера к 5' нетранслируемой области для одновременной амплификации участков в 343 п. о. энтеровирусов и 180 п. о. риновирусов. Условия ПЦР для диагностики аденовирусной инфекции были подобраны ранее (неопубликованные данные). Нуклеотидные последовательности перечисленных праймеров представлены в табл. 3.

**Синтез олигонуклеотидов.** Выбранные праймеры были синтезированы в Центральном НИИ эпидемиологии Минздрава РФ фосфоамитидным методом на синтезаторе ASM-102.

**Выделение РНК из секретов полости носа и ротоглотки.** После размораживания пробирки с зондами тщательно встряхивали, отжимали ватный тампон и, удалив его, использовали взвесь клеток и иммунных комплексов для проведения ПЦР-анализа. РНК выделяли с использованием наборов "Рибо-сорб" согласно инструкции производителя (ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ, Москва). Нуклеиновые кислоты элюировали в 40 мкл воды, обработанной диэтилпиракарбонатом.

**Реакция обратной транскрипции и ПЦР (ОТ-ПЦР).** Для постановки реакции ОТ использовали набор "Реверта" (производство Центрального НИИ эпидемиологии Минздрава РФ, Москва) со случайными гексамерными праймерами согласно инструкции по применению набора. Реакцию ОТ проводили в 40

мкл, полученную кДНК разбавляли в 5 раз ТЕ-буфером. ПЦР проводили с помощью набора "Амплисенс-200" (производство Центрального НИИ эпидемиологии Минздрава РФ, Москва) со специфическими праймерами (см. табл. 3) на амплификаторе Терцик "ДНК-Технология".

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией при подсвечивании ультрафиолетовым излучением. Размеры амплифицированных фрагментов геномов респираторных вирусов представлены в табл. 3.

**Определение нуклеотидной последовательности продуктов амплификации.** Очистку продуктов ПЦР от примесей праймеров и нуклеотидов проводили по стандартной методике выделения ДНК. ДНК элюировали и использовали в качестве матрицы для секвенирования на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2400 ("Perkin-Elmer", США) с набором ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction согласно инструкции изготовителя. Продукты реакции анализировали методом капиллярного электрофореза на автоматическом анализаторе PRISM™ ABI-310 Genetic Analyzer (PE/Applied Biosystems).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Vector NTI Suite 6, Chromas, а также Blast on line ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

Результаты тестирования клинического материала с помощью разработанной методики сравнивали с результатами, полученными при рутинном использовании РПИФ, которую проводили на лабораторной базе ДИБ № 5 с использованием реагентов производства НИИ гриппа РАМН согласно инструкции производителя [1]. Образцы для проведения РПИФ отбирали в первые дни заболевания (± 24 ч), как и для ПЦР.

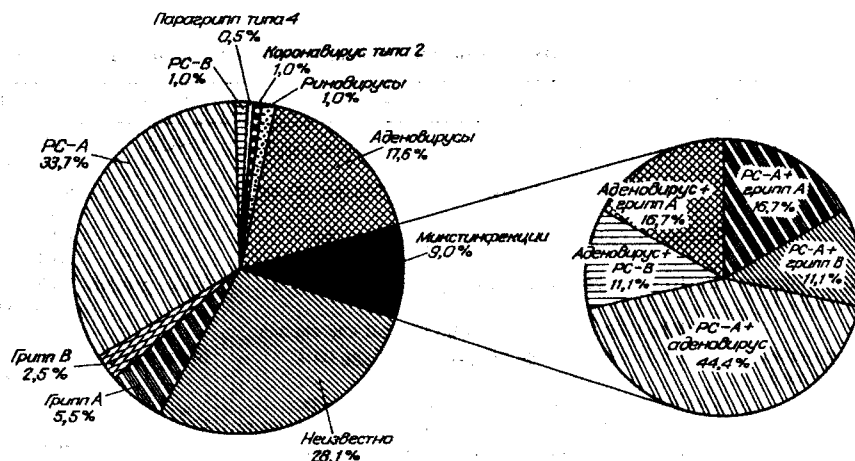
### Результаты и обсуждение

С использованием контрольных штаммов респираторных вирусов были подобраны оптимальные условия для ПЦР с праймерами к РС-А, вирусу парагриппа типов 1–3, вирусам гриппа типов А и В. В связи с отсутствием в коллекции контрольных штаммов коронавируса, риновируса, метапневмовируса, вируса парагриппа типа 4 условия ПЦР с праймерами к данным вирусам были заданы с использованием только теоретических расчетов. При проверке аналитических показателей была продемонстрирована строгая специфичность в отношении всех детектируемых вирусов и отсутствие перекрестных реакций с бактериями и вирусами других групп (см. табл. 2).

При тестировании клинического материала от 199 пациентов методом ПЦР этиологию ОРЗ удалось установить у 71,9%: вирус гриппа типа А был выявлен у 13 больных, вирус гриппа типа В — у 6, РС-А — у 73, РС-В — у 3, аденовирусы — у 43, вирус парагриппа типа 4 — у 1 ребенка, коронавирусы — у 2 детей, риновирусы — также у 2 детей (приведены абсолютные значения). Вирусы парагриппа типов 1, 2 и 3, коронавирусы типа 1 и метапневмовирусы не обнаружены ни у одного ребенка. Следует отметить, что у 18 (9%) из 199 детей имела место вирусно-вирусная микстинфекция с участием 2 представителей разных семейств. Наиболее часто встречались комбинации с аденовирусами и РС-А (см. рисунок).

При обследовании 110 детей контрольной группы аденовирусы были обнаружены у 16 (14,5%) человек, РС-А — у 1 (0,9%), вирусы гриппа, парагриппа и коронавирусы не обнаружены. Тестирование клинического материала от детей без симптомов ОРЗ на риновирусы и метапневмовирусы не проводилось.

Для подтверждения специфичности разработанной методики в отношении вируса парагриппа типа 4, риновирусов и коронавирусов были секвенированы амплифицированные фрагменты геномов выявленных вирусов и затем проведен генетический анализ. При сравнении нуклеотидных последовательностей риновирусов на участке 138 п. о. полученные изоляты различались на 13%. Один из выявленных риновирусов имел наибольшее сходство с риновирусом типа 1В (D00239) — 91% совпадений на участке 150 п. о., другой же — с риновирусом типа 2 (X02316) — 90% совпадений на участке 172 п. о.



Частота встречаемости респираторных вирусов у детей с ОРЗ.

Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов размером 380 п. о. 2 обнаруженных коронавируса показал, что данные изоляты различаются между собой всего на 3% и имеют наибольшее сходство с коронавирусом человека типа 2 (OC43) (Z21849).

В результате филогенетического анализа амплифицированного фрагмента парагриппа типа 4 (277 п. о.) оказалось, что полученный образец имеет нуклеотидную последовательность, гомологичную последовательности вируса парагриппа типа 4В (M55976) на 92%.

В связи с тропностью респираторных вирусов к различным отделам дыхательных путей частота обнаружения вирусов гриппа А, РС-А и аденовирусов в мазках из носа и из ротоглотки была неодинаковой. Так, одновременно в мазках из носа и ротоглотки вирус гриппа А был обнаружен в 61%, РС-А — в 71% и аденовирус — в 63%. Только в мазках из носа, при отсутствии в мазках из ротоглотки, вирус гриппа А был выявлен в 30%, вирус РС-А — в 17% и аденовирус — в 32%. И наоборот, только в мазках из ротоглотки, при отсутствии в мазках из носа, вирус гриппа А был выявлен в 7%, РС-А — в 10% и аденовирус — в 15%. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности сбора клинического материала для проведения ПЦР-анализа в одну пробирку одновременно со слизистых носа и ротоглотки.

Исследование методом РПИФ на наличие респираторных вирусов было проведено у 100 из 199 детей. По данным РПИФ в этиологической структуре ОРВИ доминировали вирусы парагриппа (21%) и РС-вирусы (16%). Вирус гриппа был обнаружен лишь у 1% детей, а аденовирусная инфекция — всего у 4% пациентов. В большинстве случаев (58%) этиологию ОРЗ установить не удалось. Для сопоставления эффективности ПЦР-анализа и РПИФ были выбраны наиболее часто встречающиеся РС-инфекция и парагрипп.

Методом РПИФ было обследовано 39 из 73 пациентов с РС-вирусной инфекцией, диагностированной с использованием ПЦР. Только у 12 (30,7%) человек методом РПИФ обнаружили РС-вируса, тогда как у большинства обследованных (43,8%) вирусные агенты не обнаружены, а у 25,5% был выявлен вирус парагриппа. При секвенировании амплифицированных фрагментов (размером 446 п. о.) 7 из 27 дискордантных проб и последующем сравнительном анализе с эталонными штаммами из базы данных GenBank оказалось, что все 7 изолятов обладают максимальным сходством с РС-А, что является доказательством специфичности ПЦР-анализа.

У 1 пациента с инфекцией, вызванной вирусом парагриппа типа 4, метод РПИФ не применяли.

У 21 больного, обследованного методом РПИФ, зафиксировали флюоресценцию с антителами к вирусу парагриппа. Ни у одного из этих пациентов при проведении ПЦР-анализа не удалось обнаружить РНК вирусов парагриппа, тогда как РНК РС-А была обнаружена у 12 человек, РНК вируса гриппа типа А — у 1, РНК вируса гриппа типа В — у 2, ДНК аденовируса — у 3 и у 3 детей не выявлены маркеры респираторных вирусов.

Таким образом, наблюдаемое расхождение результатов 2 методов, причины которого, вероятно, заключаются в невысоких аналитических показателях РПИФ и субъективности, неминуемой при оценке результатов РПИФ.

Разработана методика ПЦР-диагностики респираторных вирусных инфекций, позволяющая определять 12 респираторных вирусов в одной клинической пробе. Строгая специфичность ПЦР-анализа в отношении детектируемых вирусов доказана при тестировании контрольных штаммов вирусов и разнообразных вирусов и бактерий, потенциально встречающихся в дыхательных путях человека, а также при сравнительном анализе секвенированных участков генома отдельных вирусов, полученных из клинического материала, с эталонными штаммами из базы данных GenBank.

С помощью разработанной методики установлена частота встречаемости респираторных вирусов у детей с ОРЗ в Москве в период сезонного подъема заболеваемости 2001—2002 гг. Отмечено преобладание РС-вирусной инфекции — 34,7%, меньшее этиологическое значение имели вирусы гриппа — 8%, а также инфекционные агенты, как риновирусы, коронавирусы, вирусы парагриппа, были выявлены у незначительного числа больных. Следует отметить, что подобная частота обнаружения респираторных вирусов у детей соответствует зарубежным данным [13, 17]. РС-вирус вызывает 31—40% всех ОРЗ, поражает преимущественно детей раннего возраста, и 70% детей инфицируются на первом году [7, 13, 18]. Наши наблюдения подтверждают описанное ранее преобладание РС-А над РС-В в 5—10 раз [5, 9].

По данным ВОЗ, заболеваемость гриппом зимой 2001—2002 гг. в Москве находилась на уровне спорадических случаев и локальных вспышек, при этом доминировали вирусы гриппа А (H3N2), а вирусы гриппа В встречались достаточно редко (15,6%) [2], тогда как на всей территории России преобладала циркуляция вируса гриппа В (75,7—86,7%) (данные сайта <http://oms2.b3e.jussieu.fr/flunet>). Наши исследования подтверждают данные, полученные с помощью вирусологических методов [2], о преобладании вируса гриппа А над вирусом гриппа В зимой 2001—2002 гг. в Москве.

Наблюдалась практически одинаковая частота обнаружения ДНК аденовирусов в мазках со слизистых оболочек верхних дыхательных путей у больных ОРЗ и детей из контрольной группы (17,6 и 14,5% соответственно). Известно, что аденовирусы вызывают острые инфекции (фарингоконъюнктивальная лихорадка, пневмония, диарея), но также склонны к длительной персистенции в лимфоидной ткани миндалин. В связи с этим остается неясным, в каких случаях имеет место острая инфекция, а когда высокая чувствительность ПЦР-анализа позволяет выявлять латентные формы инфекции. Тем не менее полученные данные свидетельствуют о достаточно активной циркуляции аденовирусов у детей.

Следует отметить, что нами впервые была установлена циркуляция риновирусов, коронавирусов, вирусов парагриппа типа 4 и РС-В вируса у детей в Москве. Несмотря на небольшой удельный вес данных возбудителей в общей структуре ОРВИ, более детальное изучение их распространенности представляет особый эпидемиологический интерес.

Остается открытым вопрос о циркуляции метапневмовирусов в популяции детей Москвы. Вероятно, отсутствие данного возбудителя связано с небольшим количеством обследованных детей. Роль метапневмовирусов в развитии заболеваний дыхательных путей была продемонстрирована недавно — в 2001 г., и этиологическое значение данного возбудителя пока не до конца понятно [8, 16].

Низкая частота встречаемости вирусов парагриппа типа 4 и полное отсутствие вирусов парагриппа типа 1—3, вероятно, обусловлены особенностями клинической симптоматики ОРВИ в исследуемой группе детей и сезонными колебаниями, характерными для данной инфекции. По данным многочисленных клинических

наблюдений, вирусы парагриппа ассоциированы с острым ларинготрахеитом, сопровождающимся стенозом гортани различной тяжести [3, 4]. Однако клиническая больница, на базе которой была проведена настоящая работа, не является профильным учреждением по терапии ОРЗ, осложненным синдромом крупа, поэтому дети с данной нозологией не попали в проводимое исследование.

Необходимо добавить, что в результате обследования детей с ОРЗ методом ПЦР количество случаев, в которых не удалось обнаружить ни одного вирусного агента, составило всего 28,1%. Имеется ряд других инфекционных агентов (бактерии, грибы, хламидии и микоплазмы), способных вызывать заболевания дыхательных путей у детей, которые, по-видимому, и послужили причиной катаральных явлений у 1/3 обследованных больных.

Таким образом, в результате анализа работы разработан диагностический инструмент, позволяющий эффективно проводить раннюю диагностику ОРВИ. В дальнейшем планируются исследования по изучению эффективности ПЦР-анализа и рутинно используемой РПИФ в сравнении с вирусологическими методами выявления респираторных вирусов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минздравмедпрома РФ, Госкомсанэпиднадзора РФ от 19.04.1995 № 101/46 "О защите населения от гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций". — М., 1995.
2. Мониторинг гриппа в России за 2001—2002 год / Сомина А. А., Маринич И. Г., Киселев О. И. и др. — М., 2002.
3. Учайкин В. Ф. // Респиратор. забол. в педиатр. практике. — 2001. — № 6. — С. 10.
4. Фомин В. В., Гаспарян М. О. // Инфекционные болезни у детей. — Екатеринбург, 1993.
5. Carbballat G., Videla C., Sequeira M. et al. // J. Med. Virol. — 2000. — Vol. 61. — P. 275—279.
6. Gilbert L., Dakhama A., Bone B. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1996. — Vol. 34, N 1. — P. 140—143.
7. Grondahl B., Puppe W., Hoppe A. et al. // Ibid. — 1999. — Vol. 37, N 1. — P. 1—7.
8. Hoogen B., Jong J., Kuiken T. et al. // Nature Med. — 2001. — Vol. 7, N 6. — P. 719—724.
9. Imaz M., Sequeira M., Videla C. et al. // J. Med. Virol. — 2000. — Vol. 61. — P. 76—80.
10. Irmen K., Kelleher J. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2000. — Vol. 7, N 3. — P. 396—403.
11. Isaac D., Flowers D., Clarke J. R. et al. // Arch. Dis. Child. — 1983. — Vol. 59. — P. 500.
12. Kehl S., Henrikson K., Hua W. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 5. — P. 1696—1701.
13. Lina B., Valette M., Foray S. et al. // Ibid. — 1996. — Vol. 34, N 12. — P. 3007—3011.
14. Liolios L., Jenney A., Spelman D. et al. // Ibid. — 2001. — Vol. 39, N 8. — P. 2779—2783.
15. Makela M. J., Puhakka T., Ruuskanen O. et al. // Ibid. — 1998. — Vol. 36, N 2. — P. 539—542.
16. Nissen M. D., Siebert D. J., Mackay I. M. et al. // Med. J. Aust. — 2002. — Vol. 176, N 4. — P. 188.
17. Sugaya N., Mitamura K., Nirasawa M. et al. // J. Med. Virol. — 2000. — Vol. 60. — P. 102—106.
18. Whiley D., Syrmis M., Mackay I. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40, N 12. — P. 4418—4422.

Поступила 28.05.03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 615.281.8.03:618.3-06:578.828.6

Н. В. Деткова, Е. В. Соколова, М. Р. Бобкова, Е. В. Буравцова, Л. В. Серебровская

## НЕВИРАПИН (ВИРАМУН) — ПРЕПАРАТ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ ОТ МАТЕРИ К РЕБЕНКУ

Федеральный научно-методический центр Минздрава РФ по профилактике и борьбе со СПИДом Минздрава РФ, Москва

По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом, в России показатель выявляемости ВИЧ-положительных среди беременных женщин в 2002 г. увеличился в 22 раза по сравнению с 1998 г. (113,1 и 5,1

на 100 тыс. обследованных соответственно). В 2002 г. от ВИЧ-положительных женщин родились 2538 детей — 55,3% всех рожденных в России детей с риском перинатальной ВИЧ-инфекции [1]. Эпидемиологические данные свидетельствуют, что в