

С.А. Лободанов¹, А.А. Никонова¹, Г.М. Полухина², Ю.И. Забияка¹, Ф.Э. Фильченкова³,
А.Н. Каира¹, В.В. Зверев¹, Е.Б. Файзулов¹

РОЛЬ РИНОВИРУСОВ И КОРОНАВИРУСОВ В ЭТИОЛОГИИ ОРВИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва)

²Дзержинская городская больница (Дзержинский)

³Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Московской области в Люберецком районе
(г.г. Дзержинский, Лыткарино)

В работе представлены результаты выявления риновирусов (РВ) и коронавируса (КВ) в клинических образцах методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В работе исследовали 771 респираторных образцов от больных с симптомами ОРВИ, полученных в течение 2008–2011 гг. в г. Москве и Московской области. Всего при анализе 771 образца было выявлено 59 образцов, содержащих РНК РВ (7,7 %), при анализе 477 образцов (которые анализировались на наличие КВ) в 14 была выявлена РНК КВ (2,9 %). Из 73 случаев ОРВИ, сопровождавшихся риновирусной или коронавирусной моноинфекцией, в 31 случае (42,5 %) потребовалась госпитализация больных, что является показателем тяжести заболеваний. Результаты настоящей работы согласуются с последними данными научной литературы, где сообщается о том, что РВ и КВ с высокой частотой вызывают тяжелые респираторные расстройства и нередко сопровождаются осложнениями.

Ключевые слова: риновирусы, коронавирусы, мультиплексная ПЦР в режиме реального времени, лабораторная диагностика

ROLE OF RHINOVIRUS AND CORONAVIRUS IN ETIOLOGY OF ARI

S.A. Lobodanov¹, A.A. Nikonova¹, G.M. Polukhina², Ju.I. Zabiakova¹, F.E. Filchenkova³,
A.N. Kaira¹, V.V. Zverev¹, E.B. Faizuloev¹

¹Research Institute of vaccines and serum named after I.I. Mechnikov of RAMS, Moscow

²Dzerzhinsk City Hospital, Dzerzhinsk

³Territorial Department of Management Institution of Consumption in Moscow Region in Luberetskiy District, Dzerzhinsk, Litkarino

In this study, the results of rhinovirus and coronavirus detection in clinical specimens by real-time multiplex PCR (PCR-RT) have been presented. In the study, 771 respiratory samples from patients with ARI-like symptoms obtained during 2008–2011 years have been analyzed. In total, in the process of the assay of 771 samples, 59 samples containing rhinovirus RNA (7,7 %) were detected. In the assay of 477 samples analyzed for the presence of coronaviruses, in 14 cases the coronavirus RNA was detected (2,9 %). In 31 (42,5 %) of 73 ARI cases followed by rhino- or coronavirus mono-infection, the patient hospitalization was required, that indicates the severity of illnesses. The results from the present study correspond with the recent data reporting that rhinovirus and coronavirus frequently provoke severe respiratory disorders and complications.

Key words: rhinoviruses, coronaviruses real-time multiplex PCR, laboratory diagnostics

В России ежегодно регистрируют от 27,3 до 41,2 млн. случаев гриппа и других ОРВИ [2]. Удельный вес гриппа в общей структуре ОРВИ варьирует и по данным разных авторов составляет 5–25 % [1, 8]. Исторически гриппу уделяется наибольшее внимание, поскольку вирус гриппа вызывает эпидемии и пандемии, поражая людей всех возрастов, а заболевание часто протекает с осложнениями. Остальным респираторным вирусам, к числу которых относятся аденовирусы, риновирусы (РВ), респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, коронавирусы (КВ) и некоторые другие, уделяется меньшее внимание. Отчасти, это связано с отсутствием средств специфической профилактики и препаратов для этиотропной терапии таких инфекций.

Особое место в структуре ОРВИ занимают риновирусы и коронавирусы. РВ – безоболочечные РНК-содержащие вирусы семейства *Picornaviridae*, род *Enterovirus*. Геном РВ представлен одноцепочечной молекулой РНК позитивной полярности, размером ~ 7200 оснований. РВ – самая большая

группа респираторных вирусов – более 100 серотипов, и еще десятки неохарактеризованных по серотипу РВ, поскольку не все удалось выделить в культуре клеток. КВ – это оболочечные РНК-содержащие вирусы семейства *Coronaviridae*, к числу которых относятся и возбудители респираторных заболеваний человека – коронавирусы 229E и NL63 (род *Alphacoronavirus*), и HKU1, OC43, SARS-related coronavirus (род *Betacoronavirus*). Геном КВ, так же как и геном РВ, представлен одноцепочечной молекулой РНК позитивной полярности. Геномная РНК КВ самая большая среди всех РНК-содержащих вирусов – ее размер составляет приблизительно 30 000 оснований. Традиционно считается, что РВ и КВ являются возбудителями простудных заболеваний, характеризующихся поражением верхних отделов респираторного тракта и легким или среднетяжелым течением заболевания. Это позволяет некоторым исследователям объединять РВ и КВ в одну группу – возбудителей простудных заболеваний (по-английски – common cold). В настоящее время роль РВ и КВ в этиологии

ОРВИ подвергается пересмотру, поскольку по последним данным эти вирусы часто вызывают и более тяжелые заболевания.

Целью настоящего исследования было дать оценку роли РВ и КВ в этиологии респираторных вирусных заболеваний различной степени тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали 771 образец носоглоточных смывов и соскобов из носа от больных с симптомами ОРВИ, полученных на протяжении 2008 – 2011 гг. Из стационаров поступило 569 образцов, от амбулаторных пациентов – 202. Образцы собирали как от педиатрических пациентов, так и от взрослых.

Из образцов выделяли суммарную НК (с помощью наборов «QIAmp Viral RNA mini kit», (Qiagen, Германия), ZR Viral RNA Kit™ (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями производителей). Далее образцы анализировали на наличие нуклеиновых кислот (НК) основных возбудителей ОРВИ, включая РНК РВ и КВ методом мультиплексной ПЦР-РВ. В данном исследовании применяли лабораторный вариант мультиплексной ПЦР-тест-системы, предназначенной для одновременного выявления в клинических образцах двенадцати основных возбудителей ОРВИ – вирусов гриппа А и В, вирусов парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, аденовирусов, респираторно-синцитиального вируса, риновирусов, энтеровирусов, коронавируса и бокавирусов. В мультиплексной ПЦР-РВ для выявления продуктов амплификации использовали метод выщепления 5'-концевой метки (TaqMan Assay). Постановку ПЦР-РВ проводили в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», г. Москва). Каждый образец анализировали в 3 или 4 пробирках на наличие НК от 10 до 12 респираторных вирусов в присутствии внутреннего положительного контроля. Подробно процедура постановки ПЦР-анализа описана в статье А.А. Никоновой с соавт. [3]. Существенным отличием формата постановки от формата постановки, описанной в данной статье, является включение в перечень анализируемых вирусов КВ и бокавирусов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важной задачей, которую предстояло решить на подготовительных этапах выполнения настоящей работы, был выбор метода дифференциальной диагностики ОРВИ. Методами клинической диагностики с точностью определить возбудителя респираторного заболевания, невозможно – достичь этого можно только при помощи лабораторных методов диагностики. Традиционные методы идентификации респираторных вирусов имеют недостатки, прежде всего связанные с недостаточной чувствительностью (иммунофлуоресцентные методы), большой длительностью, трудоемкостью, неуниверсальностью процедуры (культуральный метод). Выявление антител к вирусам в сыворотке пациентов с помощью твердофазного ИФА является ретроспективным методом (выявляет не самого

возбудителя, а регистрирует ответ организма на инфекцию). Выявление методом ИФА вирусных антигенов в клинических образцах, ограничено недостаточной чувствительностью. Использование иммунохимических и серологических методов затрудняет также высокое антигенное разнообразие некоторых групп респираторных вирусов – аденовирусов, риновирусов, энтеровирусов и др. Традиционные методы, в силу перечисленных ограничений, не позволяют одновременно и с высокой чувствительностью выявлять в клинических образцах основные группы респираторных вирусов. В связи с вышеизложенным, в качестве основного метода исследования в настоящей работе выбрана ПЦР-РВ, достоинствами которой являются высокая специфичность, чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, автоматизация процессов, возможность выявления сразу нескольких патогенов.

В работе исследовали 771 образец, представленные носоглоточными смывами и соскобами из носа, от больных с симптомами ОРВИ. Методом мультиплексной ПЦР-РВ образцы были проанализированы на наличие нуклеиновых кислот респираторных вирусов – основных возбудителей ОРВИ. Мишенями для выявления РВ и КВ методом ПЦР-РВ служили 5'-нетранслируемый участок генома и NSP13 ген соответственно.

Всего при анализе 771 образца было выявлено 59 образцов, содержащих РНК РВ (7,7%), при анализе 477 образцов (которые анализировались на наличие КВ) в 14 была выявлена РНК КВ (2,9%). Половина всех случаев (7) обнаружения коронавирусной инфекции приходится на больных, находившихся на стационарном лечении, а из 59 положительных по РВ образцов 24 были получены от стационарных больных. Кроме того в 18 случаях РНК РВ или КВ была обнаружена в составе смешанной инфекции, в том числе 13 образцов содержали РНК РВ (5 из них были от стационарных пациентов) и 6 содержали РНК КВ (3 – от стационарных пациентов). В случаях выявления РВ и КВ в составе смешанной инфекции роль этих вирусов в этиологии заболеваний представляется менее определенной, чем в случаях моноинфекции, поскольку не представляется возможным определить, какой из выявленных вирусов вызвал первичную инфекцию и какой из них сыграл важную роль в патогенезе заболевания. В случаях же моноинфекции РВ и КВ, роль этих вирусов в этиологии заболевания можно считать установленной с высокой степенью вероятности, особенно с учетом того факта, что анализ каждого образца проводился на наличие еще по меньшей мере девяти респираторных вирусов, составляющих основу этиологической структуры ОРВИ.

Всего из 73 случаев ОРВИ, сопровождавшихся риновирусной или коронавирусной моноинфекцией в 31 случае (42,5%) потребовалась госпитализация больных, что является показателем тяжести заболеваний. Даже с учетом того факта, что в исследовании приняло участие больше стационарных

пациентов, чем амбулаторных (569 и 202 соответственно), доля больных, госпитализированных с риновирусной или коронавирусной инфекцией, остается очень высокой. Среди стационарных пациентов, в образцах от которых были выявлены РНК РВ и КВ, встречались такие клинические симптомы как пиретическая лихорадка, экспираторная одышка, гнойные осложнения, приступообразный спазматический кашель и другие.

Таким образом, в настоящей работе показано, что РВ и КВ являются возбудителями не только простудных заболеваний, но также с высокой частотой способны вызывать тяжелые заболевания, требующие госпитализации.

Развитие методов дифференциальной диагностики ОРВИ, в особенности молекулярных методов, позволило в последние годы уточнить и скорректировать представления об этиологической структуре ОРВИ и роли разных вирусов в этиологии тех или иных болезней. По последним данным научной литературы риновирусная инфекция может осложняться развитием отита, бронхита, бронхоолита, пневмонии. Имеются также исследования, свидетельствующие о том, что РВ могут вызывать поражения и нижних дыхательных путей, «запуская» развитие таких тяжелых заболеваний, как бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [6]. Заболевания, вызванные КВ инфекцией также могут осложняться бронхоолитами и пневмониями, а у педиатрических пациентов развитием ложного крупа и фебрильных судорог [5]. Не следует также забывать, что в 2003 г. мир столкнулся с угрозой пандемии атипичной пневмонии или ТОРС (тяжелый острый респираторный синдром), возбудителем которой является коронавирус [4, 7].

ВЫВОДЫ

1. Результаты настоящей работы согласуются с последними данными научной литературы, где сообщается о том, что РВ и КВ с высокой частотой

вызывают тяжелые респираторные расстройства, и нередко сопровождаются осложнениями.

2. Полученные результаты и данные литературы свидетельствуют о необходимости пересмотра существующих представлений о РВ и КВ как возбудителях ОРВИ с легким или среднетяжелым течением заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кокорева С.П., Сахарова Л.А., Куприна Н.П. Этиологическая характеристика и осложнения острых респираторных инфекций у детей // Вопросы современной педиатрии. — 2008. — Т. 7, N 1. — С. 47–50.

2. Острые респираторные заболевания у детей : учебно-методическое пособие // С.О. Ключников [и др.]. — М., 2009. — С. 36.

3. Применение метода мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций / А.А. Никонова [и др.] // Журн. микробол. — 2009. — № 1. — С. 67–70.

4. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome / P.A. Rota [et al.] // Science — 2003. — Vol. 300, N 5624. — P. 1394–1399.

5. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method / E.R. Gaunt [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2010. — Vol. 48, N 8. — P. 2940–2947.

6. Gern J.E. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma // J. Virol. — 2010. — Vol. 84, N 15. — P. 7418–7426.

7. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome / C. Drosten [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 348, N 20. — P. 1967–1976.

7. Nasopharyngeal acute phase cytokines in viral upper respiratory infection / J.A. Patel [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2009. — N 11. — P. 1002–1007.

Сведения об авторах

Лободанов Сергей Александрович – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (115088, Москва, 1-ая Дубровская ул., д. 15, Отдел вирусологии им. О.Г. Анджалидзе; тел. (495) 674 4584; E-mail: lobodanov@yahoo.com)

Никонова А.А. – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва, к.б.н. (тел. (495) 674 4584)

Полухина Г.М. – заведующая детским инфекционным отделением МУ «Дзержинская городская больница», «Заслуженный работник здравоохранения Московской области», «Почетный медицинский работник города Дзержинского», врач высшей категории (тел. (495) 551 5072)

Забияка Ю.И. – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва (тел. (495) 674 7798)

Фильченкова Ф.Э. – заместитель начальника территориального отдела управления Роспотребнадзора по Московской области в г. Дзержинский, Лыткарино, по Люберецкому району, (тел. (495) 554 8123)

Каира А.Н. – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва, д.м.н. (тел. (495) 674 4584)

Зверев В.В. – директор НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва, д.б.н., профессор, академик РАМН, (105064, Москва, пер. М. Казенный, 5а; тел. (495) 917 4900)

Файзулов Евгений Бахтиёрович – заведующий лабораторией молекулярной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, к.б.н. (115088, Москва, 1-ая Дубровская ул., д.15, Отдел вирусологии им. О.Г. Анджалидзе; тел. (495) 674 4584; E-mail: faizulov@mail.ru)