

УДК 61-053.2:578.7

**АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА HERPESVIRIDAE
СРЕДИ ДЕТЕЙ НИЖНЕГО НОВГОРОДА****Н.Ф. Бруснигина, Е.В. Сперанская, О.М. Черневская,
М.А. Махова, К.А. Орлова, Н.Н. Кленина,**

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»

Бруснигина Нина Федоровна – e-mail: mazepavn@mail.ru

В статье представлены результаты ПЦР обследования 13 378 новорожденных и детей возрасте от 1 месяца до 16 лет, здоровых и больных различными заболеваниями органов дыхания, пищеварения, опорно-двигательного аппарата. С использованием оптимизированных алгоритмов исследования на основе метода ПЦР установлены региональные особенности распространения герпесвирусов (Herpes simplex I/II, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes VI) среди детей Нижнего Новгорода.

Ключевые слова: распространенность, Herpes simplex I/II, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes VI, ПЦР, дети.

The results of PCR examination of 13378 newborns and children from 1 month to 16 years old healthy and sick with different diseases of respiratory, gastrointestinal tracts, locomotor apparatus are presented in the article. There are shown the regional peculiarities of the herpesviruses (Herpes simplex I/II, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes VI) distribution among the children in Nizhny Novgorod by using PCR detection.

Key words: distribution, Herpes simplex I/II, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes VI, PCR, children.

Введение

Герпесвирусные инфекции (ГВИ) являются одной из ведущих медико-социальных проблем современного здравоохранения [1, 2, 3]. Герпесвирусы (ГВ) широко распространены в человеческой популяции, ими инфицировано 65–90% взрослого и детского населения планеты. В настоящее время известно более 100 ГВ, из которых от человека выделено лишь 8 [2]. ГВ пантропны, способны поражать все органы и системы организма хозяина и персистировать в организме пожизненно. ГВИ характеризуются полиморфизмом клинических проявлений и многообразием форм. По данным ВОЗ, смертность, обусловленная вирусами герпеса, занимает второе место после гриппа. Следует отметить неблагоприятное, порой фатальное влияние герпесвирусов на течение беременности и родов, патологию плода и новорожденных [4].

Неблагоприятная экологическая обстановка, снижение уровня социальной защиты населения и, как следствие этого, угнетение защитных сил организма способствовали существенному увеличению числа больных герпесом в России [4]. Особую актуальность ГВИ имеют в детском возрасте в связи с высоким уровнем инфицированности, разнообразием путей передачи, возможностью развития тяжелых клинических форм и прогностически неблагоприятных последствий в отдаленном будущем даже при субклинических вариантах течения заболевания [5]. На территории РФ различными формами герпетических инфекций по данным ряда авторов страдают около 20 миллионов человек [2, 6, 7, 8], однако, в связи с отсутствием в нашей стране обязательной регистрации заболеваемости ГВИ истинное количество больных неизвестно.

В США и странах Западной Европы ГВИ также являются одной из ведущих медико-социальных проблем. По данным литературы герпетическую природу имеют около 10% энцефалитов, 0,6% асептических менингитов, 20% менингоэнцефалитов [9, 10, 11].

Наиболее актуальными являются исследования на наличие герпесвирусов при профилактике осложнений беременности и инфицирования плода, при обследовании часто болеющих детей [12, 13, 14].

У иммунокомпетентных лиц вирус может длительно находиться в состоянии персистенции или слабой репликации без выраженных клинических проявлений. Реактивация персистирующего вируса способна привести к развитию острой или хронической инфекции. На фоне иммунодефицита возможно развитие острых манифестных форм заболевания, особенно тяжело протекающих у новорожденных и детей раннего возраста [15, 16]. Клинический полиморфизм герпетических инфекций приводит к тому, что больные попадают в поле зрения врачей различных специальностей, диагноз зачастую носит топический характер и этиопатогенетическое лечение теряет четкие очертания, что является одной из наиболее типичных врачебных ошибок [5].

Метод ПЦР, широко используемый в настоящее время для детекции большинства инфекционных агентов, является наиболее предпочтительным для выявления герпесвирусов, так как позволяет исследовать любой биологический субстрат, обладает высокой чувствительностью, специфичностью, скоростью получения результата, возможностью одновременного исследования большого числа проб.

Работы, посвященные многолетнему изучению циркуляции широкого спектра герпесвирусов у детей различных возрастов при разных патологиях на территории Российской Федерации, отсутствуют.

Цель исследования: изучение распространенности вирусов семейства *Herpesviridae* у детей разных возрастных групп с различными формами патологии.

Материалы и методы

За период 1998–2012 гг. обследовано 13 378 новорожденных и детей в возрасте от 1 месяца до 16 лет – пациентов Нижегородского НИИ детской гастроэнтерологии, областной детской клинической больницы, городских детских больниц №№1, 27, 39 (Н. Новгород), детских отделений 23 инфекционной больницы (Н.Новгород) и Кстовской ЦРБ. Контрольная группа состояла из 127 здоровых детей в возрасте от 3 до 16 лет.

Показанием к проведению ПЦР-детекции вирусов семейства *Herpesviridae* (*Herpes simplex I/II*, *Cytomegalovirus*, *Epstein Barr virus*, *Herpes VI*) являлось подозрение на внутриутробное инфицирование ребенка, наличие в анамнезе у детей частых (не менее трех–четырёх случаев в год) заболеваний: ОРЗ/ОРВИ с явлениями полилимфоаденопатии, гепатоспленомегалии, длительного субфебрилитета, воспалительных заболеваний органов дыхания, органов пищеварения, симптомов поражения кожи и слизистых, центральной нервной системы, опорно-двигательного аппарата.

Материалом для исследования служили образцы мочи, слюны, слезного отделяемого, крови. Отбор, транспортировку и хранение клинического материала проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» [17].

Образцы крови отбирали в вакуумные системы, не содержащие антикоагулянтов и других реактивов менее 2 мл. При клинически выраженной полилимфоаденопатии и лихорадочном состоянии ребенка проводили исследование лейкоцитарной массы. Для выделения лейкоцитов кровь отбирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (ЭДТА) 2–4 мл. Образцы мочи отбирали до подмывания ребенка. Собирали первую порцию утренней мочи не более 2 мл. Образцы слюны отбирали утром до чистки зубов, натошак. Слезное отделяемое или смыв с конъюнктивы отбирали до умывания.

Исследования осуществляли методом ПЦР: традиционная ПЦР, Real-Time PCR. Для проведения ПЦР использовали амплификаторы «Терцик МС-2» (ДНК-технология, Москва), «Gene Cycler» (Bio-Rad, США), Rotor Gene 6000 (Corbet Research, Австралия).

Выделение ДНК проводили наборами «ДНК-сорб Б» разработки и производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией по применению.

Использовали тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИЭ (Москва) и «Gene-Pak DNA PCR test» («Изоген», Москва).

Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с последующей регистрацией результатов с использованием программы «Bio-test».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики, методов

оценки достоверности результатов (критерий Стьюдента t). Достоверными считались границы, установленные при вероятности безошибочного прогноза $p < 0,05$. Качественные признаки представлены с указанием стандартной ошибки доли ($\pm m$).

Результаты и их обсуждение

Метод ПЦР позволяет выявлять ДНК герпесвирусов только в период активной репликации вирусной ДНК. В это время вирус может быть обнаружен в слюне, моче и реже в крови. В латентный период, когда вирусы сохраняются в клетках нервных ганглиев, гепатоцитах, эндотелиоцитах и др., они не выявляются в биологических жидкостях организма методом ПЦР. Положительный результат ПЦР свидетельствует не только о присутствии герпесвирусов, но и об их активизации в макроорганизме. Метод ПЦР является наиболее информативным и объективным тестом при первичной диагностике герпесвирусных инфекций, он позволяет достоверно судить о присутствии вирусов и о его активном размножении в макроорганизме.

На модели Cytomegalovirus (CMV) был определен оптимальный субстрат для выявления вирусов семейства Herpesviridae. Анализ частоты выявления ДНК CMV в различных биологических жидкостях: кровь, слюна, слезное отделяемое, моча, смесь этих субстратов – представлен в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, наиболее информативно выявление вирусов семейства Herpesviridae в смеси субстратов мочи, слюны, слезного отделяемого. В связи с этим в дальнейшей работе ДНК выделяли из смеси биологических субстратов (слюна, моча, слезное отделяемое) от каждого пациента. Субстраты смешивали в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов типа «ДНК-Сорб В». ДНК из крови или лейкоцитарной массы выделяли отдельно, исследуемый объем 100 мкл.

ТАБЛИЦА 1.

Частота выявления CMV в различных субстратах

Субстрат	Кол-во проб	Частота выявления ДНК CMV	
		Абс.ч.	%
Кровь	768	53	6,9±1,0
Слюна	142	23	16,2±3,1
Слезное отделяемое	33	4	12±5,6
Моча	180	37	6,9±3,0
Смесь субстратов (моча, слюна, слезное отделяемое)	2624	764	29±0,9

ТАБЛИЦА 2.

Частота выявления герпесвирусов у детей при патологии различных органов

Форма патологии	Частота выявления в %			
	CMV	EBV	HSV I/II	HHV VI
Заболевания органов дыхания (n=640)	41,5±1,7	46,8±1,6	12,7±4,1	59,4±3,1
Патология органов пищеварения (n=214)	27,1±2,8	36,7±3,5	1,7±0,9	67,5±3,2
Патология опорно-двигательного аппарата (n=205)	25,5±3,1	58,8±3,3	11,5±2,2	37,4±3,3
Патология ЦНС (n=186)	1,9±1,1	15,3±2,9	3,7±1,2	20,9±2,8
Патология органов кроветворения (n=315)	37,9±2,6	46,8±2,7	2,3±2,2	85,3±1,7
Здоровые (n=127)	27,2±3,9	42,8±4,3	1,3±1,0	78,2±3,6

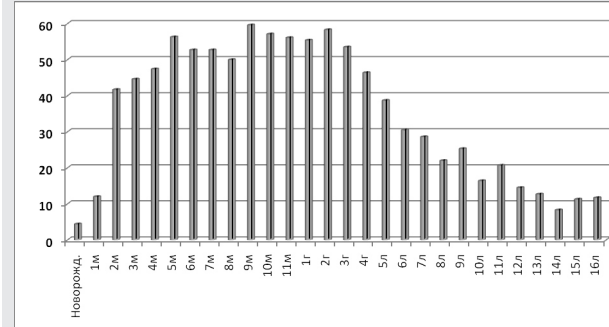


РИС. 1.

Частота выявления ДНК CMV в группах детей от 0 до 16 лет.

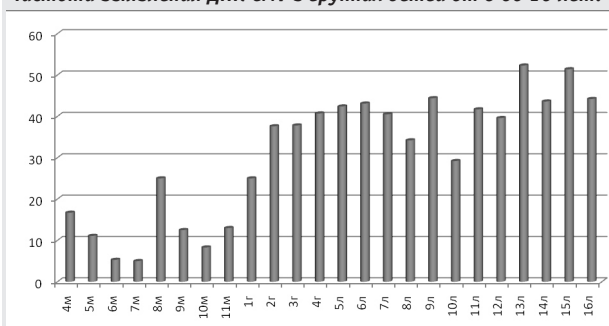


РИС. 2.

Частота выявления ДНК EBV в группах детей от 0 до 16 лет.

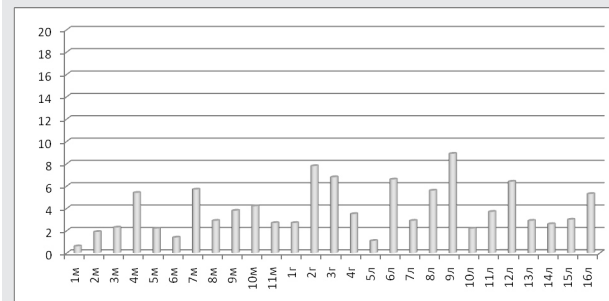


РИС. 3.

Частота выявления ДНК HSV I,II в группах детей от 0 до 16 лет.

При наличии клинических проявлений (лихорадочное состояние, гепатоспленомегалия, полилимфоаденопатия) проводили исследование лейкоцитарной массы.

Данные о частоте выявления ДНК CMV, Epstein-Barr virus (EBV), Herpes simplex I/II (HSV I/II) у детей разных возрастных групп представлены на рисунках 1, 2 и 3.

Проведенные исследования показали широкую распространенность вирусов группы герпеса среди детей – жителей Нижнего Новгорода (CMV – 58%; EBV – 52%; HSV I,II – 9,0%).

Установлены возрастные этапы колонизации макроорганизма герпесвирусами. Наиболее активная колонизация организма человека вирусами семейства Herpesviridae наблюдается в первые годы жизни (от 0 до 3 лет), частота выявления вирусной ДНК у детей 2–3-летнего возраста превышает в 10 и более раз аналогичные показатели у новорожденных. Наиболее высокие показатели частоты выявления ДНК CMV отмечались в группе детей в возрасте 2–3 лет (58–59%). У 4-летних детей и детей старших возрастов активность репликации Cytomegalovirus снижается и частота выявления ДНК к 14–16 годам составляет 8–11%, что вероятно связано со становлением иммунной системы (рис. 1).

Анализ распространенности вируса Epstein-Barr среди детей разных возрастных групп выявил следующие тенденции: у новорожденных частота выявления EBV составляла 4,4%, в течение первого года жизни она варьировала от 4,8 до 12,5%, а к 2-летнему возрасту отмечено резкое увеличение числа инфицированных, частота обнаружения ДНК EBV возрастает почти в 10 раз и достигает 38%. Но в отличие от CMV снижения вирусной активности EBV у детей старших возрастов не наблюдается, а происходит дальнейший рост числа инфицированных, максимальные показатели частоты обнаружения ДНК EBV отмечены в группе подростков в возрасте 13–16 лет (44–51%).

Характерен резкий подъем частоты выявления ДНК Herpes simplex I/II (более чем в 20 раз) у детей первых лет жизни (с 0,3% у новорожденных до 7,8% у детей в возрасте 2 лет). По мере взросления резкие изменения показателей частоты обнаружения ДНК вируса не отмечены. Частота выявления ДНК Herpes simplex I/II у детей в возрасте от 2 до 16 лет варьировала от 2,2 до 9,0% (рис. 3).

В последние годы актуальны исследования, посвященные изучению инфекции у детей, ассоциированной с вирусом герпеса человека 6-го типа (HHV-6). Установлено, что HHV-6 является этиологическим фактором или кофактором многих патологических состояний у детей и взрослых. Заражение детей происходит в возрасте 0,5–3 года. После первичного заражения ребенка возможно несколько вариантов развития болезни: от псевдокраснухи до возникновения недифференцируемых заболеваний, сопровождающихся лихорадочным состоянием, судорожным приступом, сыпью. Причиной почти трети всех судорожных приступов у детей в возрасте до двух лет является HHV-6, что свидетельствует об активном размножении вируса в центральной нервной системе. Основным путем передачи – воздушно-капельный, но не исключены парентеральный, вертикальный и половой пути [2, 12].

Одной из задач нашего исследования являлось определение частоты инфицированности HHV-6 детей с патологией различных органов. Частота обнаружения ДНК вируса Herpes 6-го типа варьировала от 5,1 до 85,7% в зависимости от возраста и нозологической формы заболевания.

Результаты ПЦР-обследования на инфицированность герпесвирусами 1560 часто болеющих детей с различными заболеваниями органов дыхания (ОРЗ/ОРВИ, бронхит, пневмония), пищеварительного тракта (хронический гастродуоденит, дискинезии различных отделов желудочно-кишечного тракта, дисфункциональные расстройства билиарного тракта, эрозивно-язвенный процесс слизистых оболочек ЖКТ, пищевая аллергия), опорно-двигательного аппарата (артриты) и больных лейкозами представлены в таблице 2.

Установлено, что частота выявления ДНК Cytomegalovirus в группе детей с патологиями органов дыхания была достоверно выше, чем в группах детей с другими патологиями (опорно-двигательного аппарата – $t=3,5$; $p<0,001$; органов пищеварения – $t=5,2$; $p<0,001$) и в группе здоровых детей ($t=2,7$; $p<0,01$). Обращает внимание высокая частота выявления CMV при всех заболеваниях органов дыхания: при пневмонии CMV обнаруживался в 52,8% случаев, при остром бронхите – в 52,5%, при ОРЗ/ОРВИ – в 49,4%, при астме – в 40,9%.

Частота выявления ДНК Herpes simplex I/II в группах пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата и органов дыхания оказалась достоверно выше, чем в группах детей с патологией пищеварительного тракта ($t=2,63$; $p<0,01$), детей больных лейкозом ($t=2,61$; $p<0,01$) и в группе здоровых детей ($t=2,1$; $p<0,05$).

Максимальный показатель частоты выявления ДНК Epstein-Barr virus зарегистрирован в группе детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Он составил 59%. Во всех изученных группах частота выявления ДНК Epstein-Barr virus оказалась высокой. У больных с заболеваниями органов дыхания этот показатель составил 47%, у больных с патологией пищеварительного тракта – 36,5%, у больных лейкозом – 47%, в группе здоровых детей – 42,8%.

Следует отметить высокую частоту смешанного инфицирования вирусами группы герпеса детей всех возрастных групп при всех формах патологии. В группе детей от 1 года до 16 лет смешанное инфицирование наблюдалось чаще, чем в группе детей до года. Основными вариантами ассоциаций были CMV и HHV 6, EBV и HHV 6, CMV и EBV. В 6,5% случаев обнаружены ассоциации из трех вирусов CMV, EBV и HHV 6. У двух пациентов выявлена ассоциация из четырех представителей семейства Herpesviridae.

Выводы

1. Вирусы семейства Herpesviridae широко распространены среди детей, проживающих в Нижнем Новгороде. ДНК Cytomegalovirus обнаружена у 58% детей, ДНК Epstein-Barr virus – у 52%, ДНК Herpes simplex I/II – у 9%, Herpes у 6–72%.
2. Определены возрастные этапы колонизации макроорганизма герпесвирусами.
3. Установлены достоверные различия частоты выявления репликации герпесвирусов у детей с различными формами патологии органов дыхания, пищеварения, кроветворения, ЦНС и опорно-двигательного аппарата.
4. Высокая частота обнаружения вирусов семейства Herpesviridae свидетельствует о целесообразности и необходимости обследования детей с различными заболеваниями ЦНС, желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, опорно-двигательного аппарата на герпесвирусы с целью назначения эффективной противовирусной и иммуномодулирующей терапии.



ЛИТЕРАТУРА

1. Гранитов В.Н. Герпесвирусная инфекция. М.: Мед.книга, 2001. 80 с.
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. СПб.: СпецЛит, 2006. 303 с.
3. Черноусов А.Д., Егорова Н.Ю., Гусев Л.Н. Инфекционный мононуклеоз, ассоциированный с вирусами герпеса IV, V, VI типов. Детские инфекции. 2005. № 3. С. 6–11.
4. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные, микоплазменные заболевания гениталий. Руководство для врачей. Изд-е 6-е. М. 2003. 438 с.
5. Краснов В.В. Инфекционные болезни в практике педиатра: справочник для врачей. Изд. НижГМА. Нижний Новгород. 2008. 352 с.
6. Архипова Е.И., Исаков В.А. Социальная значимость распространения герпеса и ВИЧ-инфекции. Современные подходы к профилактике и лечению. Матер. научной сессии ННЦ СЗО РАМН. Н. Новгород: Медицина, 2003. Т. 2. С. 66–76.
7. Молочков В.А., Киселев В.И., Семенова Т.Б. Генитальные вирусные инфекции. Изд. «Бином пресс». 2009. 208 с.
8. Нисевич Л.Л., Талалаев А.Г., Каск Л.Н. и др. Врожденные вирусные инфекции и маловесные дети. Вопр. совр. пед. 2002. Т. 1. С. 9–13.

9. Bristow B.N., O'Keefe K.A., Shafir S.C. et al. Congenital Cytomegalovirus Mortality in the United States, 1990-2006. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2011. V. 5. № 4. P. 1140.
10. Cheeran M.C.J., Lokensgard J. R., Schleiss M.R. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. Clin. Microbiol. Rev. 2009. Vol. 22. № 1. P. 99-126.
11. Corey L., Wald A. Maternal and Neonatal HSV Infections. N. Engl. J. Med. 2009. Vol. 361. № 14. P. 1376-1385.
12. Edelman D.C. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. Virol. J. 2005. Vol. 2. P. 78.
13. Pena K.C., Adelson M.E., Mordechai E. et al. Genital Herpes Simplex Virus Type 1 in Women: Detection in Cervicovaginal Specimens from Gynecological

Practices in the United States. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48. № 1. P. 150-153.

14. Казанцев А.П., Попова Н.И. Внутритрубные инфекционные заболевания у детей и их профилактика. Л.: Медицина, 1990. 250 с.
15. Межидова А.А. Выявление белков цитомегаловируса в клетках и тканях плодов и умерших детей. Патологическое действие ЦМВ на клеточный цикл и структуры митотического аппарата: Автореф. дис.канд. мед. наук. М. 2002. 27 с.
16. Орджоникидзе Н.В., Тюлюник В.Л. Цитомегаловирусная инфекция и беременность. Акуш. и гин. 2002. № 3. С. 59-63.
17. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания МУ 4.2.2039-05 от 23.12.2005 г.