

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС, ЦИТОКИНОВЫЙ ОТВЕТ У ДЕТЕЙ С НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Р.К. Бабик

ЧелГМА, г. Челябинск

В статье представлены результаты изучения места норовирусов в этиологии острых кишечных инфекций у детей, проходивших лечение в детской клинической больнице № 8 г. Челябинска в период с 2005 по 2009 гг. Уточнены варианты клинического течения норовирусной инфекции у детей в различные возрастные периоды. В исследовании проанализирован характер иммунного ответа и цитокинов у детей при норовирусной инфекции.

Ключевые слова: норовирусная инфекция, ПЦР-диагностика, цитокины, дети.

В настоящее время в этиологической структуре острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей значительно преобладает доля вирусов [1–3, 7]. В последние годы активно изучаются норовирусы, первоначально названные Norwalk virus по той местности, где в 1968 году была зарегистрирована вспышка острого гастроэнтерита среди школьников начальной школы. Название норовирус (род Норовирус, семейство Caliciviridae) было утверждено Международным комитетом по таксономии вирусов в 2002 году. Геном норовирусов определяет одноцепочная РНК. Норовирусы классифицируют на 5 геногрупп (GI, GII, GIII, GIV и GV), которые подразделяются на разные кластеры или генотипы. Геногруппы I, II и IV вызывают поражения у человека. Геногруппа II содержит 19 генотипов норовируса. Норовирусы геногруппы II, генотипа 4 (GII4), являются причиной большинства вспышек гастроэнтерита у взрослых [5, 6].

На протяжении последних лет норовирусы находятся на втором месте после ротавирусов среди диагностируемых возбудителей ОКИ [3, 7]. Однако клиничко-эпидемиологические аспекты ОКИ норовирусной этиологии у детей до конца не раскрыты [3, 4]. Представляется актуальным, в связи с развитием методов генной диагностики и расширением возможности этиологической верификации ОКИ, оценить клиническую значимость норовирусной инфекции у детей. Изучение уровня цитокинов, показателей иммунного ответа у детей с норовирусной инфекцией позволяет охарактеризовать реализацию механизмов действия противовирусной защиты при развитии этого инфекционного заболевания.

Целью данной работы явилось изучение распространенности и клинических особенностей течения ОКИ норовирусной этиологии у детей разных возрастных групп с оценкой их иммунного статуса, уровня цитокинов.

Пациенты и методы. Проведено обследование 276 детей, больных ОКИ норовирусной этиологии, в возрасте от 1 недели до 14 лет, госпитализированных в инфекционное кишечное отделение

детской клинической больницы № 8 г. Челябинска в 2005–2009 гг.

Лабораторная диагностика, наряду со стандартными методами обследования больных ОКИ, включала исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) фекалий в ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва). Для исследований методом ПЦР забор материала производили в течение первых 72 часов после госпитализации детей. Предварительную обработку материала осуществляли в вирусологической лаборатории клиники Челябинской медицинской академии. Транспортировали материал в условиях «холодовой цепи». Тестирование образцов фекалий проводилось с использованием реагентов ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Проводили скрининг образцов на норовирусы, с определением их генотипов, кроме того, исключали наличие в образцах ротавирусов группы А, астровирусов, аденовирусов, шигелл и энтероинвазивных *E. Coli* (EIEC), сальмонелл, термофильных кампилобактеров. В 2005 году материал исследовался с применением разработанных в ЦНИИЭ (г. Москва) тест-систем с электрофоретической детекцией продуктов амплификации АмплиСенс®. Для мультиплексной гибридизационно-флуоресцентной детекции наиболее распространенных возбудителей ОКИ использовали тест-системы «АмплиСенс® ОКИ-скрин». Для определения норовирусов применяли методики типирования на основе использования специфических праймеров и зондов. Для выявления редких типов норовирусов применяли метод прямого секвенирования. С целью оптимизации работ по выявлению редких генотипов норовирусов в 2006 году были выбраны олигонуклеотиды, специфичные для преобладающего в настоящее время на территории Российской Федерации генетического кластера G2.4 (Бристоль).

Клиническое наблюдение за всеми детьми проводили с момента поступления в стационар до

выписки. Подробно изучали эпидемиологический анамнез, симптомы заболевания, сроки их появления и исчезновения. Учитывали также развитие у части пациентов осложнений. Всем детям были проведены общие клинические лабораторные исследования в 1–2 сутки с момента поступления в стационар и перед выпиской. В тяжелых, осложненных случаях, негладком течении ОКИ дополнительно проводили исследование биохимических, электролитных параметров и оценку кислотно-щелочного состояния организма ребенка.

Иммунологическое обследование детей проводилось в ЦНИЛ Челябинской медицинской академии. Изучали иммунный статус пациентов в остром периоде норовирусной инфекции, до начала лечения, по содержанию в крови кластеров дифференцировки (CD) моноклональных субпопуляций лимфоцитов, концентрации IgA, IgM, IgG и ЦИК, цитокинов ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10 и РАИЛ.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ «SPSS 13.0», «Biostatistica 4.03» и приложения Excel из пакета MS Office XP. Сравнение параметрических величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, непараметрических величин – точным методом Фишера, методом хи-квадрат. Результаты сравнений считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [4].

Результаты исследования и их обсуждение. У детей, госпитализированных в детскую клиническую больницу № 8 г. Челябинска, кишечные инфекции норовирусной этиологии по частоте регистрации занимают второе место после ротавирусных диарейных заболеваний, составляя 36,89 % в общей структуре заболеваемости ОКИ. В 96,40 % ($n = 266$) случаев норовирусной инфекции у больных был определен второй генотип данного вируса и лишь у 3,60 % ($n = 10$) пациентов выявлен его первый генотип. Норовирусная инфекция встречалась как в виде моно-, так и микст-заболевания (в 57,25 % и 42,75 % случаев соответственно).

В структуре сочетанных инфекций норовирусно-вирусные ОКИ составили 74,58 % ($n = 88$), из них, норо-ротавирусные ОКИ – 69,32 % ($n = 61$), норо-астровирусные ОКИ – 7,95 % ($n = 7$), норо-аденовирусные – 22,73 % ($n = 20$). Микст норовирусно-бактериальные ОКИ составили 25,42 % ($n = 30$), из них, смешанных с сальмонеллезом, было 9,30 % ($n = 11$), шигеллезом – 0,84 % ($n = 1$), кампилобактериозом – 13,55 % ($n = 16$), шигеллезом и кампилобактериозом – 1,69 % ($n = 2$).

Клинические особенности норовирусной инфекции изучались при втором генотипе – моноформе. Наиболее часто данная инфекция определялась у детей в возрасте 1–3 лет (в 54,40 % случаев).

Проведен статистический анализ частоты выявления и продолжительности основных клинических симптомов ОКИ норовирусной этиологии у детей в разных возрастных группах.

У детей, заболевших норовирусной инфекцией на первом году жизни, в клинике превалировал диарейный синдром. С увеличением возраста детей нарастали частота и продолжительность рвоты, в то время как выраженность и продолжительность диарейного синдрома уменьшались. Рвота у детей первых трех месяцев жизни регистрировалась в 23,1 % случаев наблюдений и была менее выражена, чем у пациентов других возрастных групп. Длительность заболевания этих детей была несколько большей, в связи с более продолжительной по времени лихорадкой и диарейным синдромом.

Обращает на себя внимание, что у значительного количества детей в каждой возрастной группе (от 16 до 39 %) в первые сутки заболевания не было подъема температуры тела. Температурная реакция у 1–3-месячных детей была в 100 % случаев, но с первого дня болезни ее подъем отмечался лишь в 61,53 % случаев наблюдений. Для этой группы детей была характерна фебрильная температура тела. Преобладающим в клинике норовирусной инфекции у детей 13–24 и 25–36 месяцев жизни было острое начало болезни с появления рвоты (в 100 % случаев наблюдений), чаще упорного характера, со средней продолжительностью более двух суток.

Катаральные симптомы, характеризующиеся умеренно выраженной заложенностью носа и гиперемией ротоглотки, с увеличением возраста детей встречались реже.

В клинической картине ОКИ норовирусной этиологии у детей первых 6 месяцев жизни превалировал энтеритный вариант. Наибольшая продолжительность диарейного синдрома отмечалась у детей первого полугодия, что было обусловлено в большей степени измененной жидко-кашицеобразной консистенцией стула, чем увеличенной его кратностью. Экскреция у детей первого года жизни развивалась значительно реже по сравнению с пациентами возрастных групп 13–24 месяцев и 25–36 месяцев жизни, в которых преимущественно встречалась гастроэнтеритическая форма норовирусной инфекции. Синдром кишечного токсикоза диагностировался в этих же возрастных группах (в 9,1 % и 8,7 % случаев соответственно). У детей старше 3 лет при норовирусной инфекции чаще встречалась гастроэнтеритическая форма, длительность заболевания определялась менее продолжительными лихорадкой ($1,45 \pm 0,12$ дн.), рвотой ($1,08 \pm 0,1$ дн.), диареей ($1,39 \pm 0,15$ дн.), чем у детей раннего возраста.

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов у детей в острый период норовирусной инфекции представлены в табл. 1.

В сравнении с контрольной группой изменение иммунного ответа у детей в остром периоде норовирусной инфекции выражалось в уменьшении содержания в периферической крови некоторых субпопуляций лимфоцитов. Так, было снижено содержание в периферической крови CD8-лимфоцитов. Было определено выраженное снижение CD3 антигенов, которые экспрессируют

Проблемы здравоохранения

только Т-клетки. Определенный интерес представляло выявление снижения содержания субпопуляций CD16 у больных в остром периоде норовирусной инфекции. Известно, что эти рецепторы (CD3 и CD16) экспрессируются преимущественно на мембранах NK-клеток (естественные киллеры). С низкой активированностью NK, вероятно, связано достоверное снижение CD11b, также экспрессируемые этими клетками. NK-клетки являются эффекторным механизмом противовирусной защиты. В частности, NK-клетки, наряду с активированными Т-лимфоцитами, служат источниками образования интерферона гамма (ИФН-γ). Статистически значимо снизились значения CD95-рецепторов, индуцирующих Fas-зависимый апоптоз клетки. Достоверно не изменилось среднее значение содержания CD25-молекулы, которая является

рецептором для интерлейкина-2 (ИЛ-2) и экспрессируется на ранних стадиях активации Т-клеток иммунной системы. Не изменилось значение показателя HLA-DR, что экспрессируется на активированных Т-, В-клетках, моноцитах и является маркером состоявшейся активации иммунной системы. Достоверно не изменилось у обследованных детей с норовирусной инфекцией и содержание маркера фенотипически незрелых клеток – CD34.

В своих исследованиях, оценивая величины иммуноглобулинов в периферической крови детей в первые дни острой кишечной инфекции норовирусной этиологии, не выявили достоверных изменений показателей гуморального иммунитета (табл. 2).

Определенное значение придавалось изучению параметров цитокинов в ответ на норовирусы (табл. 3).

Таблица 1

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов у детей с норовирусной инфекцией

Показатели	Здоровые дети, n = 39	Норовирусная инфекция, n = 28	Достоверность различий, P
CD3	38,87 ± 2,54	25,66 ± 1,23**	P < 0,001
CD4	25,12 ± 1,41	22,82 ± 1,73	P > 0,05
CD8	22,97 ± 1,90	17,25 ± 1,10*	P < 0,05
CD4CD8	1,25 ± 0,07	1,41 ± 0,10	P > 0,05
CD11b	19,79 ± 1,77	14,78 ± 1,62*	P < 0,05
CD16	17,33 ± 1,25	13,07 ± 1,13*	P < 0,05
CD25	14,28 ± 1,15	15,13 ± 1,48	P > 0,05
CD34	13,69 ± 1,56	11,83 ± 1,79	P > 0,05
CD56	14,10 ± 0,89	12,40 ± 1,22	P > 0,05
CD95	21,53 ± 1,92	10,40 ± 0,84***	P < 0,001
HLA-DR	16,30 ± 1,00	16,31 ± 1,87	P > 0,05

Примечание. Различия значимы при *** p < 0,001 и * p < 0,05 по сравнению с показателями здоровых детей.

Таблица 2

Показатели гуморального звена иммунитета у детей при норовирусной инфекции

Показатели	Здоровые дети, n = 39	Норовирусная инфекция, n = 28	Достоверность различий, P
CD20, %	21,66 ± 1,6	19,77 ± 1,49	P > 0,05
IgA, г/л	0,25 ± 0,04	0,39 ± 0,15	P > 0,05
IgM, г/л	0,98 ± 0,06	0,96 ± 0,16	P > 0,05
IgG, г/л	7,77 ± 0,97	7,09 ± 2,46	P > 0,05
ЦИК, у. е.	89,74 ± 9,49	64,78 ± 9,67	P > 0,05

Таблица 3

Содержания цитокинов в периферической крови детей с норовирусной инфекцией, пг/мл

Цитокины	Здоровые дети, n = 15	Среднетяжелая форма ОКИ, острое течение, n = 15	Тяжелая форма ОКИ, затяжное течение, n = 12
ИЛ-1 α	155,32 ± 31,88	883,55 ± 28,34***	32,41 ± 8,66***
ИЛ-1 β	12,81 ± 4,13	73,04 ± 15,51***	14,32 ± 3,17
ИЛ-8	54,0 ± 6,02	279,48 ± 39,29***	155,53 ± 64,35
ИЛ-4	6,61 ± 1,03	5,35 ± 0,86	5,09 ± 0,17
ФНО-α	2,37 ± 0,89	1,85 ± 0,06	2,11 ± 0,22
ИФН-α	8,01 ± 0,84	13,23 ± 1,61*	9,08 ± 1,68
ИФН-γ	38,28 ± 2,08	688,18 ± 140,96***	92,06 ± 24,95*
РАИЛ	152,97 ± 42,16	681,88 ± 236,26*	181,33 ± 88,79

Примечание. Различия значимы при *** p < 0,001, * p < 0,05 по сравнению с показателями здоровых детей.

Норовирусная инфекция у детей, протекавшая, преимущественно, в среднетяжелой форме, была сопряжена значительным достоверным повышением в крови цитокинов: ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИФН- α , ИФН- γ и РАИЛ. При этом уровни содержания в сыворотке крови ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8 повысились в 5–6 раз, значение ИФН- γ увеличилось в 16 раз. Величины ИЛ-4 и ФНО- α у пациентов на момент обследования не отличались от значений аналогичных показателей группы здоровых детей.

У пациентов с тяжелой формой норовирусной инфекции и негладким, затяжным течением концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО- α , ИФН- α и РАИЛ не имели достоверных отличий от величин этих показателей групп здоровых детей. Кроме того, проявлялся дефицит ИЛ-1 α , среднее значение которого снизилось в 4,5 раза. Повышение ИФН- γ в периферической крови детей с тяжелым, негладким течением норовирусной инфекции не проявилось столь существенно как у пациентов со среднетяжелой формой. Повышение показателя ИЛ-8 было недостоверным.

Выводы

1. ОКИ норовирусной этиологии по частоте регистрации занимает второе место после ротавирусной инфекции. Наиболее часто норовирусной инфекцией болеют дети 13–36 месяцев жизни.

2. У детей, заболевших на первом году жизни, в клинике превалировал диарейный синдром. С увеличением возраста нарастали частота и длительность рвот, в то время как выраженность и продолжительность диарейного синдрома уменьшались.

3. Затяжное течение ОКИ норовирусной этиологии с более длительным диарейным синдромом чаще выявлялось у детей первого года жизни, в то время как тяжелые формы заболевания с упорными рвотами, осложненные синдромами токсикоза и эксикоза, регистрировались чаще у детей 13–36 мес.

4. С изменением ответа системы цитокинов могут быть связаны особенности клинического

течения норовирусной инфекции у детей разных возрастных групп. Норовирусная инфекция у детей, протекавшая в среднетяжелой форме, была сопряжена значительным достоверным повышением в крови цитокинов: ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИФН- α , ИФН- γ и РАИЛ. У детей с тяжелым течением реакция иммунной системы проявилась недостаточной продукцией ИФН- γ и ИФН- α на фоне дефицита ИЛ-1 α , ИЛ-1 β .

Литература

1. Ильина, Н.О. Клиническая оценка метода ПЦР в диагностике острых кишечных инфекций / Н.О. Ильина, Л.Н. Мазанкова, А.Т. Подколзин // *Детские инфекции*. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 61–64.
2. Мухина, А.А. Калицивирусная инфекция / А.А. Мухина, Г.А. Шипулин, А.Т. Подколзин // *Инфекционные болезни*. – 2004. – Т. 2, № 2. – С. 64–73.
3. Подколзин, А.Т. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы / А.Т. Подколзин, А.А. Мухина, Г.А. Шипулин // *Инфекционные болезни*. – 2004. – Т. 2, № 4. – С. 85–91.
4. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ / О.Ю. Реброва. – М., 2006. – 312 с.
5. Genotyping of GI.4 and GI.2 norovirus RT-PCR amplicons by RFLP analysis / S. Ramirez, G.M. Giammanco, S. De Grazia et al. // *J. Virol. Methods*. – 2008. – Vol. 147 (2). – P. 250–256.
6. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000 / M.A. Widdowson, A. Sulka, S.N. Bulens et al. // *Emerging Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 11 (1). – P. 95–102.
7. Proportion of sporadic of gastroenteritis cases caused by rotavirus, norovirus, adenovirus and bacteria in Japan from January 2000 to December 2003 / A. Sumi, N. Kobayashi, N. Ohtomo et al. // *J. Microbiol. immunol.* – 2005. – Vol. 49, № 8. – P. 745–746.

Поступила в редакцию 2 мая 2010 г.