

УДК: 57.083.3:616.98:578.835.1Enterovirus(571.620)"2018/2019"

РЕЗУЛЬТАТЫ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЭНТЕРОВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ В 2018-2019 ГГ.

В.И. Резник^{1,2}, Е.Н. Присяжнюк¹, Л.В. Савосина¹, Л.А. Лебедева^{1,2},
Т.В. Корита², З.П. Жалейко¹, Е.Ю. Сапега², Л.В. Бутакова², С.И. Привалов³

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация;

²ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация;

³КГБУЗ «Городская больница №2» министерства здравоохранения Хабаровского края, г. Комсомольск-на-Амуре, Российская Федерация

Выявление специфических антител к разным серотипам энтеровирусов в сыворотке крови в динамике позволило в 2018-2019 гг. подтвердить у части больных диагноз энтеровирусной инфекции, в том числе при невозможности выделения возбудителей на культурах тканей. На примере Хабаровского края продемонстрировано использование сведений о напряженности коллективного иммунитета к отдельным серотипам энтеровирусов в прогнозировании эпидемической ситуации на предстоящий сезон. Удалось подтвердить роль изученных в 2018 г. показателей напряженности коллективного иммунитета к серотипу Коксаки В5 при составлении прогноза циркуляции данного серотипа и связанной с ним заболеваемости в следующем, 2019 году. Проводимый в плановом порядке серологический контроль позволяет выявлять группы людей, наиболее подверженных риску заболевания, оценить степень защищенности лиц от энтеровирусной инфекции, дать оценку и составить прогноз изменения эпидемической ситуации на конкретной территории.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция, серологическая диагностика, напряженность иммунитета, Хабаровский край

RESULTS OF SEROLOGICAL RESEARCH ON ENTEROVIRUS INFECTION IN Khabarovsk REGION IN 2018-2019 YEARS

V.I. Reznik^{1,2}, E.N. Prisyazhnuk¹, L.V. Savosina¹, L.A. Lebedeva^{1,2}, T.V. Korita², Z.P. Zhaleiko¹,
E.Yu. Sapaga², L.V. Butakova², S.I. Privalov³

¹FBIH "Center of hygiene and epidemiology in Khabarovsk region", Rospotrebnadzor (the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing), Khabarovsk, Russian Federation;

²FBIS Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russian Federation;

³KGPFI "Municipal hospital №2" of the Ministry of Healthcare of the Khabarovsk region, Komsomolsk-on-Amur, Russian Federation.

Identification of specific antibodies against different enterovirus serotypes in blood serum in dynamics during 2018-2019 years allowed to confirm in a part of patients the diagnosis of enterovirus infection including those cases with inability of isolation of pathogen on the cell culture. Using Khabarovsk territory as an example, utilization of level of herd immunity data against particular enterovirus serotypes in forecasting epidemic situation for upcoming season was demonstrated. The role of evaluated levels of herd immunity against Coxsackie B5 serotype in aiding the development of in question serotype circulation forecast and its association with incidence rate during the next 2019 year was confirmed. The routinely conducted serological control allows to reveal most at risk groups of people that can be easily infected as well as evaluate levels of protective immunity against enterovirus infection and give a forecast of epidemic situation changes on the territory of interest.

Key words: enterovirus infection, serological diagnosis, immunity stress, Khabarovsk region

Введение

Для лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций (ЭВИ) применяют разные подходы, в том числе выявление специфических антител к разным серотипам энтеровирусов (ЭВ) в сыворотке

крови в динамике [1, 2, 5]. Для серологической диагностики ЭВИ используют преимущественно реакцию нейтрализации (РН) инфекционности. Известно, что нейтрализующие антитела появляются уже на ранних этапах энтеровирусной инфекции, одновременно с появлением симптомов заболевания. Они обычно типоспецифичны и сохраняются в организме много лет, вероятно, в течение всей жизни [8]. Заражение одним серотипом может привести к появлению низкого уровня быстро исчезающих антител к другим типам энтеровирусов [5, 8].

Для диагностических целей используют две пробы сыворотки, первую из которых берут как можно раньше после начала болезни, а вторую – через 2-3 недели после первой. Диагноз инфекции подтверждается значительным подъёмом титра специфических антител во второй пробе. Диагностически значимым считается нарастание титра антител в 4 раза и больше [1, 5]. В связи с тем, что данный тест является серотип-специфическим и весьма трудозатратным, рационально его использовать в качестве вспомогательного метода диагностики ЭВИ, особенно в тяжёлых случаях ЭВИ [1, 3, 8].

Следует отметить, что определение антител к энтеровирусам проводят не только с диагностической целью, но и при изучении эпидемиологических аспектов инфекции [1, 6, 7, 8]. Для эпидемиологических исследований, в частности, для изучения коллективного иммунитета населения к определённому серотипу энтеровируса, достаточно одной пробы сыворотки от каждого обследуемого, при этом внимание следует обращать на правильный отбор обследуемых лиц и компоновку групп для получения наиболее представительных результатов [5].

Итогом серологического мониторинга является оценка уровня фактической защищённости от инфекции отдельных лиц, коллективов и населения в целом. Следовательно, серологический мониторинг является одним из элементов эпидемиологического надзора за энтеровирусной инфекцией, поскольку эпидемиологическое благополучие в отношении данного заболевания определяется состоянием коллективного иммунитета [1].

Цель данного исследования – изучить диагностическую и прогностическую значимость выявления антител к различным серотипам энтеровирусов у больных ЭВИ Хабаровского края и лиц, перенесших данную инфекцию.

Материалы и методы

В основе определения титров антител с помощью РН лежит принцип взаимодействия известного вируса с гомологичными антителами, присутствующими в сыворотке, что проявляется в виде отсутствия цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) на культуре клеток. Согласно общепринятой методики [4, 5], разведения сыворотки (двукратные или пятикратные до, приблизительно, 1/2500) смешивали с равными объёмами разведения вируса, содержащего 100 ТЦД₅₀ (тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя) в том объёме смеси, который будет введен в культуру при заражении. Смесь выдерживали 2 часа при 37 °С и вносили в 2-3 пробирки или лунки с культурой клеток.

Контроли при проведении РН включали: наименьшее (1:4) разведение сыворотки для проверки токсичности; контроль качества клеток со средой; титрование рабочей дозы вируса.

Титром сыворотки считали наибольшее разведение, защищающее 50% зараженных культур от действия 100 ТЦД₅₀ вируса.

Результаты и обсуждение

В статье проанализированы результаты серологической диагностики ЭВИ, проведенные в Хабаровском крае в 2018 и 2019 гг.

Так, в 2018 году парные сыворотки крови были отобраны у 81-го заболевшего г. Комсомольска-на-Амуре с диагнозом энтеровирусная инфекция. Для исследования в реакции нейтрализации (РН) использовали актуальные для г. Комсомольска 5 серотипов энтеровирусов, выделенных в данном эпидсезоне (табл. 1). Учитывали, как четырехкратные и большие, так и двукратные сероконверсии. Наиболее значительные приросты антител выявлены к энтеровирусу 70 типа – 37,0%, и Коксаки В5 – 29,0%. В 11 случаях зарегистрированы четырехкратные сероконверсии к 2-м и более вирусам. Всего лиц с положительными сероконверсиями выявлено в 63,0% случаев. У 32-х заболевших были собраны одиночные пробы крови в сроки от 2 до 11 дня болезни.

Таблица 1.

Результаты серологической диагностики энтеровирусных инфекций в г. Комсомольск-на-Амуре в 2018 г. (n=81)

Серотип, место выделения вируса		4*кратные и > сероконверсии	2*кратные сероконверсии	Всего сероконверсий
Энтеровирус 70, г. Комсомольск	абс.	24	6	30
	%	29,6	7,4	37,0
Коксаки В5, г. Комсомольск	абс.	18	6	24
	%	22,2	7,4	29,6
Коксаки В2, г. Комсомольск	абс.	2	6	8
	%	2,5	7,5	9,9
Коксаки А4,	абс.	6	9	15

г. Хабаровск	%	7,4	11,1	18,5
ЕСНО 6,	абс.	2	2	4
г. Комсомольск	%	2,5	2,5	4,9
Всего полож. лиц по	абс.	37	14	51
сероконверсиям	%	45,7	17,3	63,0

Для оценки коллективного иммунитета на наличие антител к пяти серотипам вирусов, 113 обследуемых больных были разделены на две группы (81 человек с парными сыворотками и 32 с одиночными). Наибольшее число серопозитивных лиц было к вирусу Коксаки А4 – 94,7%, причем все в высоких титрах $\geq 1/32$ (табл. 2).

Таблица 2.

**Оценка иммуноструктуры к энтеровирусам возбудителям ЭВИ в
г. Комсомольск-на-Амуре в сезон 2018 года (n=113)**

Серотипы вирусов, число обследованных лиц	Всего лиц с антителами		Из них с высоким уровнем антител 1/32 и выше *	
	абс.	%	абс.	%
Энтеровирус 70 113 чел.	88	77,9	74	65,5
Коксаки В5 113 чел.	62	54,9	58	51,3
Коксаки В2 113 чел.	54	47,8	43	38,1
Коксаки А4 113 чел.	107	94,7	107	94,7
ЕСНО 6 113 чел.	23	20,4	19	16,8

Примечание: * - с учетом сероконверсий (т.е. учтены титры антител)

К энтеровирусу 70 типа 77,9% обследованных содержали иммуноглобулины (Ig), причем 65,5% в высоких титрах – $\geq 1/32$. К вирусу Коксаки В5 выявлено 54,9% серопозитивных лиц, из них в титрах $\geq 1/32$ – 51,3%. К вирусу Коксаки В2 удельный вес серопозитивных составил 47,8%, с титрами $\geq 1/32$ – 38,1%. Наименьшее число серопозитивных обнаружено к вирусу ЕСНО 6 – 20,4%, из них с высокими уровнями антител всего 16,8%. К этому серотипу выявлено и наименьшее число сероконверсий – 4,9%, что свидетельствует о слабой циркуляции данного серотипа в г. Комсомольске-на-Амуре.

В 2018 г. проведена оценка уровня коллективного иммунитета и в г. Хабаровске, причем среди двух групп здорового населения: детей 3-4 лет и подростков 16-17 лет (табл. 3). Для исследования использовали два серотипа энтеровирусов Коксаки В5 и энтеровирус 71 типа. Выбор этих серотипов обусловлен тем, что энтеровирус 71 типа редко выявляется среди больных ЭВИ, а вирус Коксаки В5 в прошлом сезоне практически не циркулировал в г. Хабаровске, в 2017 г. был выделен всего 1 штамм этого серотипа. В сезоне 2018 г. в г. Хабаровске выделено 5 штаммов Коксаки В5 (9,8% среди всех выделенных вирусов), что стало признаком начавшейся активной циркуляции вируса. С целью построения прогноза циркуляции Коксаки В5 данные об уровне коллективного иммунитета к нему представляют определенный интерес. Как показали результаты исследования, у детей 3-4-х лет почти в 70,0% в 2018 г. не было антител к этому серотипу, а в группе 16-17 лет серонегативными оказались 58,8%.

Таблица 3.

**Возрастная иммуноструктура к энтеровирусам Коксаки В5
и энтеровирусу 71 в г. Хабаровске III кв. 2018 г.**

Серотип		Коксаки В5	Энтеровирус 71
Группы наблюдения			
Дети 3-4 года			
Обследовано		94	83
из них с антителами	абс.	29	59
	%	30,9	71,1
в т.ч. $T \geq 1/32$	абс.	15	28
	%	16,0	33,7
Дети 16-17 лет			
Обследовано		84	79
из них с антителами	абс.	35	57
	%	41,2	72,1
в т.ч. $T \geq 1/32$	абс.	21	44
	%	24,7	55,7
Всего обследовано		178	162
из них с антителами	абс.	64	116
	%	35,9	71,6

в т.ч. Т ≥ 1/32	абс.	36	74
	%	20,2	45,7

Выбор серотипа энтеровируса 71 обусловлен необходимостью постоянного наблюдения за ним в связи с возможной его высокой вирулентностью. В группе детей 3-4-х лет 71,1% обследованных были серопозитивными, причем 33,7% содержали Ig в титрах ≥1/32. Практически такой же показатель серопозитивных был и в группе 16-17 лет – 72,1%, но с большей долей лиц с высоким уровнем антител ≥1/32 – 55,7%.

В 2019 г. серологические исследования проведены только в г. Комсомольске-на-Амуре. С целью серодиагностики у 42 заболевших собраны парные сыворотки крови. Первые пробы крови забирала в первые 2-5 дней заболевания, повторно – через 7-15 дней. Сыворотки исследовались в РН на культурах клеток с вирусами, доминировавшими в вышеуказанном сезоне в г. Комсомольске-на-Амуре: на долю Коксаки В3 пришлось 39,5% среди положительных случаев в 2018 г.; Коксаки В5 – 18,4; ЕСНО7 – 18,4%. Сероконверсии (то есть повышение титра антител) к вирусу Коксаки В3 выявлены в 2019 г. в 21,4% случаев (в 9 из 42), с учетом 4-х кратных и 2-х кратных приростов концентрации антител (табл. 4).

В 7-ми случаях в сыворотках крови Ig к вирусу Коксаки В3 выявлены в высоких титрах – 1/1024 и, возможно, выше, т.к. определение титра проводили только до этого разведения. С учетом этих семи случаев, в группе обследованных больных с парными сыворотками крови суммарно положительными на антитела к Коксаки В3 оказались 38,1%, причем в трех случаях из них на культуре тканей были выделены энтеровирусы Коксаки В3.

Ниже приводим описание указанных трёх случаев:

1. Больной Л.А., 12 лет, диагноз – ЭВИ; I-я сыворотка забрана на 4-й день болезни, II-я на 20-й, титр антител к Коксаки В3 – 1/64; 1/256, вирус выделен из фекальной пробы.

2. Больной З.С., 4 года, диагноз – ЭВИ; I-я сыворотка забрана на 10-й день болезни, II-я на 21-й, титр антител – 1/1024; 1/1024, вирус выделен из фекальной пробы.

3. Больной Г.Р., 7 лет, диагноз – СВМ; I-я сыворотка забрана на 2-й день болезни, II-я на 11-й, титр антител – 1/256; >1/512, вирус выделен из фекальной пробы.

Таблица 4.

**Серологическая диагностика энтеровирусных инфекций у больных ЭВИ
в г. Комсомольске-на-Амуре в 2019 году**

Серотип вируса	Обследовано лиц парными сыв. – 1 Одиночно – 2 Всего – 3			Результаты РН			
				4хкратные и > сероконвер.	2х кратные сероконвер.	Высокие титры а/т без сероконверсий	Всего положительных случаев
Коксаки В3	1	абс.	42	7	2	7	16
		%	100,0	16,7	4,8	16,7	38,1
	2	абс.	29	-	-	8	8
		%	100,0	-	-	27,6	27,6
	3	абс.	71	-	-	15	24
		%	100,0	-	-	21,1	33,8
Коксаки В5	1	абс.	42	2	6	2	10
		%	100,0	4,8	14,3	4,8	23,8
	2	абс.	29	-	-	1	1
		%	100,0	-	-	3,4	3,4
	3	абс.	71	-	-	3	11
		%	100,0	-	-	4,2	15,5
ЕСНО7	1	абс.	42	10	1	2	13
		%	100,0	23,8	2,4	4,8	31,0
	2	абс.	29	-	-	1	1
		%	100,0	-	-	3,4	3,4
	3	абс.	71	-	-	3	14
		%	100,0	-	-	4,2	19,7

Одиночные пробы крови, отобранные ещё у двух вирусовыделителей Коксаки В3, содержали высокие титры антител к данному вирусу – 1/512 и ≥ 1/1024.

Сероконверсии у больных ЭВИ к вирусу Коксаки В5 составили 19,1%, а с двумя случаями одиночных проб сывороток крови с высокими титрами антител – 23,8% положительных результатов. К вирусу ЕСНО7 суммарные положительные показатели составили 31,0% случаев.

Среди 29 случаев заболеваний ЭВИ, в которых исследовались только одиночные сыворотки крови, наибольшее число больных с высоким уровнем (≥ 1/1024) антител было к вирусу Коксаки В3 – 8

случаев, тогда как к вирусам Коксаки В5 и ЕСНО7 – по одному случаю. Всего у 49 из 71-го (69,0%) обследованного больного энтеровирусная этиология подтверждена серологически – более чем двукратным повышением уровня антител в парных сыворотках и/или при наличии высокого титра антител в одиночных сыворотках крови.

Проведенная нами в 2019 г. оценка иммуноструктуры к вышеуказанным энтеровирусам среди лиц, перенесших энтеровирусную инфекцию, показала высокие уровни антител к вирусу Коксаки В3 у 49,3%, Коксаки В5 – у 12,7%; к вирусу ЕСНО7 – у 9,8% обследованных (табл. 5).

Таблица 5.

Оценка иммуноструктуры (по РН) к возбудителям ЭВИ у лиц, перенесших энтеровирусную инфекцию в г. Комсомольск-на-Амуре в сезон 2019 г.

Серотипы вирусов		Число обследованных	Выявлены антитела у обследованных				Всего лиц без антител
			Низкие 1/8-1/32	Средние 1/64-1/256	Высокие 1/512-1/1024	Всего лиц с антителами	
Коксаки В3	абс.	71	6	12	35	53	18
	%		8,5	16,9	49,3	74,6	25,4
Коксаки В5	абс.	71	14	20	9	43	28
	%		19,7	28,2	12,7	60,6	39,4
ЕСНО 7	абс.	71	38	9	7	54	17
	%		53,5	12,7	9,8	76,1	23,9

Сведения об оценке специфического иммунитета к энтеровирусу Коксаки В5, полученные в 2018 году у населения г. Хабаровска и г. Комсомольска-на-Амуре, позволили предположить возможность активной циркуляции этого серотипа в г. Хабаровске и слабой – в г. Комсомольске-на-Амуре в следующем эпидсезоне, то есть в 2019 году. Данный прогноз практически подтвердился. Так, в г. Хабаровске в сезон 2019 г. вирус Коксаки В5 был доминирующим, составив 33,1% среди типированных на культуре клеток энтеровирусов. В г. Комсомольске-на-Амуре этот серотип определен в 18,4%, заняв 3 место по удельному весу среди выделенных серотипов в 2019 году.

Заключение

Таким образом, с помощью серологических исследований отчасти удалось подтвердить диагноз в случаях отсутствия выделения энтеровирусов на культурах тканей. Показано использование данных о напряженности коллективного иммунитета к энтеровирусам в прогнозировании эпидемической ситуации по ЭВИ на предстоящий сезон. Так, удалось подтвердить роль показателей напряженности коллективного иммунитета к серотипу Коксаки В5 при составлении прогноза циркуляции данного серотипа и связанной с ним заболеваемости в следующем году.

В целом, плановый серологический контроль позволяет выявлять группы людей, наиболее подверженных риску заболевания, оценить степень защищенности лиц от ЭВИ, дать оценку и составить прогноз изменения эпидемиологической ситуации на конкретной территории.

Литература

1. Демина А.В., Терновой В.А., Шульгина Н.И., Нетесов С.В. Энтеровирусы. Часть 3. Лабораторная диагностика, лечение, иммунопрофилактика и профилактические мероприятия в очаге (обзорная статья) // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Том 31, №3. – С. 115-122.
2. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т.4, №1. – С. 27-36.
3. Козлов В.Г., Хапчаев Ю.Х., Ишмухаметов А.А. Энтеровирусная (неполио) инфекция и проблемы её диагностики // Менеджмент РЕМЕДИУМ. – 2014. - №12. – С. 49-52.
4. Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича: МУК 4.2.2410-08. – Москва, 2008.
5. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции: МУ 3.1.1.2363-08. – Москва, 2008.
6. Buxbaum S., Berger A., Preiser W. et al. Enterovirus infections in Germany: comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods // Infection. – 2001. – V. 21 (3). – P. 138-142.
7. Pallansch M.A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and never enteroviruses / Fields' Virology. Ed. Knipe D.N., Howley P.M. et al. – 5th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007/ - P. 839-893.
8. Polio Laboratory Manual. WHO, Geneva, 2004.

Сведения об ответственном авторе:

Резник Вадим Израилевич – кандидат мед. наук, врач-вирусолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», ведущий научный сотрудник Дальневосточного регионального центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, e-mail: poliokhv@mail.redcom.ru
