НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ
ІМЕНІ Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

АНДРЮШКОВА НАТАЛЯ ГРИГОРІВНА

УДК 616.831-005-036.11-092:616-022.7:578.835.1

ЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОЗВИТКУ ГОСТРОГО ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ

03.00.06 – вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Науковий керівник:

академік НАН та НАМН України, доктор медичних наук, професор **Широбоков Володимир Павлович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Рибалко Світлана Леонтіївна**, Державна установа «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», завідуюча лабораторією експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій;

кандидат медичних наук, доцент **Кукало Оксана Володимирівна**, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, доцент кафедри вірусології.

Захист відбудеться «23» квітня 2019 р. об 11:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.614.01 при ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» за адресою: 03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 5.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України» за адресою: 03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 5.

Автореферат розісланий «27» лютого 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат медичних наук **Т.Л. Мартинович**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На даний час у розвитку інфекційної патології людини все більшого значення набувають ентеровіруси. Науковий інтерес до них зумовлений низкою причин: кількість виділених видів ентеровірусів щорічно збільшується, розширюється спектр захворювань, виникнення яких пов'язують з цією інфекцією, завдяки використанню сучасних методів діагностики. Ряд авторів (Амосова К.М., 1996; Анохін В.А. та ін., 2014; Бондаренко В. І. та ін., 2008; Бондаренко А.Л. зі співавт., 2012; Гиріна О.Н., 1996; Журба Т.Б., 1985; Задорожна В.І., 2012; Кротенко О.В., 2001; Плоткин В.Я. зі співавт., 2013, 2015, 2016; Широбоков В.П. та ін., 1998, 1999; Яговкін Е.А. зі співавт., 2016; Caserta T., 2013; Imed G. et al., 2012) вказують на патогенетичну роль ентеровірусів при інфаркті міокарду, міокардиті, перикардиті, дилятаційній кардіоміопатії, атеросклерозі, гострому коронарному синдромі, в патології нирок, розвитку апендициту, при гепатиті, панкреатиті, юнацькому діабеті, дерматомікозах, псоріазі.

Встановлення ролі ентеровірусних інфекцій у розвитку судинної патології головного мозку є актуальним на сьогодні. Ці захворювання складають від 30% до 50% хвороб серцево-судинної системи. В їх структурі провідне місце належить гострим порушенням мозкового кровообігу (ГПМК). За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструється 15 млн випадків інсультів, а смертність від інсультів складає 12-15% загальної смертності, посідаючи третє місце після захворювань серця і злоякісних пухлин. В Україні перше місце серед причин смертності населення припадає на серцево-судинні захворювання, питома вага яких у 2013 р. склала 66,5 %. За прогнозами ВООЗ на 2020 рік, ішемічна хвороба серця та цереброваскулярні хвороби увійдуть до десяти основних причин тягаря хвороб у країнах з ринковою економікою та колишніх соціалістичних країнах, складаючи, відповідно, 11,2% та 6,2% від загального тягаря хвороб.

На даний час вважається, що інфекційні та запальні процеси є факторами ризику розвитку інсульту (Жусупова А.С., 2017; Манахаев Б.К., 2016; Chen L. et al., 2018; Urbanek C. et al., 2010). Вперше було висловлено припущення про зв'язок коронарного склерозу курчат з інфекційним агентом, який пізніше віднесли до родини Herpesviridae, у 1950 році, і лише майже тридцять років потому досліди з інфекційного моделювання атеросклерозу були відтворені Fabricant із співавторами (Fabricant C.G. et al., 1978, 1983). Розглядається можлива причетність вірусів простого герпесу 1 та 2 типів (Herpes siplex virus 1 (HSV1) та Herpes siplex virus 2 (HSV2)), вірусу вітряної віспи (Varicella zoster virus, VZV), цитомегаловірусу (Citomegalovirus, CMV), Епштейн-Барр вірусу (Epstein-Barr virus, EBV) (Breuer J. et al., 2014; Galassi G. et al., 2018; Snider S.B. et al., 2014), аденовірусів (Kutleza M. et al., 2009), вірусів грипу (Sessa R. et al., 2014), ентеровірусів (Kis Z. et al., 2007), Chlamidia pneumonie (Tumurkhuu G. et al., 2018) та їх асоціацій (Voorend M. et al., 2008; Fugata J.E. et al., 2014) у розвитку ГПМК.

Вперше гіпотезу про роль вірусів в патогенезі судинного захворювання підтверджено шляхом виявлення антигенів вірусу Коксакі В в атеросклеротично

зміненій аорті (Burch G.E. et al., 1973). Розширення вірусологічних досліджень засвідчило, що більшість випадків неревматичного захворювання серця обумовлені ентеровірусами (Амосова К.М., 1996; Кротенко О.В., 2001; Палєєв Ф.Н., 2016; Широбоков В.П. та ін., 1999; Andreoletti L. et al., 2007; Li L. et al., 2018; Nikitskaya E.A. et al., 2014; Tan G. et al., 2018). Сучасні вірусологічні дослідження доводять інтенсивну циркуляцію ентеровірусів в різноманітних об'єктах навколишнього середовища (Доан С.І. та ін., 2018; Caserta T., 2013; Wiyatno A. et al., 2016; Pogka V. et al., 2017). Не з'ясованими залишаються особливості циркуляції різноманітних серотипів ентеровірусів, механізмів змін домінуючих в циркуляції серотипів ентеровірусів та причин виникнення епідемічних спалахів (Задорожна В.І., 2012, 2015; Battistone A. et al., 2014). Майже не висвітлено питання про етіопатогенетичну роль ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК. Актуальність вирішення вказаної проблеми зростає в умовах збільшення питомої ваги в загальній структурі захворюваності інфекцій, спричинених ентеровірусами, що обумовило виконання даного дослідження, його мету і завдання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконувалася відповідно до плану науково-дослідних робіт (НДР) кафедри неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (НМУ імені О.О. Богомольця) та є фрагментом НДР «Клініко-параклінічна характеристика і патогенетичні співставлення у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, оптимізація методів лікування та профілактики рецидиву» (термін виконання 2014-2017 рр., № державної реєстрації 0114U001358).

Мета та завдання дослідження. Метою досліджень, представлених у дисертаційній роботі, є вивчення ролі ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

Завдання дослідження, зумовлені поставленою метою, передбачали:

1. Проаналізувати наукові джерела щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань.
2. Виділити ентеровіруси за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження з сироваток крові хворих з ГПМК.
3. Ідентифікувати ентеровіруси, виділені з сироваток крові хворих з ГПМК, за допомогою реакції віруснейтралізації.
4. Виявлення генетичних маркерів виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК.
5. Визначити присутність РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
6. Дослідити присутність специфічних імуноглобулінів М та G в парних сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).
7. Провести порівняльний аналіз результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння (пацієнти без судинної патології) для вивчення ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Об'єкт дослідження: ентеровірусні маркери у сироватках крові хворих з ГПМК.

Предмет дослідження: ентеровіруси; присутність геному ентеровірусів у сироватках крові хворих, наявність специфічних антитіл (імуноглобулінів М та G) до ентеровірусів.

Методи дослідження. При проведенні дослідження було використано методи:

– бібліосемантичний – для вивчення вітчизняного та світового досвіду стосовно досліджуваної проблеми;

– вірусологічний (виділення ентеровірусів та їх ідентифікація з вивченням генетичних маркерів);

– молекулярно-генетичний (постановка ПЛР);

– серологічний (постановка ІФА);

– медико-статистичний – для збору, обробки, аналізу отриманої під час дослідження інформації.

Наукова новизна отриманих результатів. В результаті проведених експериментальних досліджень вперше було доведено достовірно більшу частоту виділення геномів ентеровірусів з сироваток крові хворих з ГПМК, ніж у пацієнтів групи порівняння. Виділено та ідентифіковано штами ентеровірусів з сироваток крові хворих з ГПМК. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками, які можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК. Виявлено присутність специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих основної групи. Сформульовано припущення про персистуючий характер ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК. Визначено можливу тригерну роль гострої та хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

За результатами роботи науково обґрунтовано доцільність застосовування поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову та внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів.

Теоретичне значення одержаних результатів полягає в суттєвому доповненні знань щодо етіології ГПМК, зокрема, у встановленні можливої тригерної ролі ентеровірусної інфекції як пускового механізму у розвитку ГПМК.

Практичне значення одержаних результатів полягає у тому, що основні положення та висновки даного дослідження стали підставою для:

– розробки пропозицій щодо діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК;

– удосконалення навчальних програм підготовки лікарів на додипломному та післядипломному рівнях на кафедрах мікробіології, вірусології та імунології, нервових хвороб;

– розробки лекційних курсів та написання посібників з мікробіології, вірусології та імунології, нервових хвороб.

На основі результатів дослідження було отримано патент «Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу» (93020 UA).

Впровадження результатів дослідження проводилось на галузевому рівні: у навчальному процесі Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (акт впровадження), при підготовці посібників, лекцій, методичних розробок у курсі викладання мікробіології, вірусології та імунології у вищих медичних навчальних закладах (ВМНЗ) України.

Особистий внесок здобувача. Молекулярно-генетичні, вірусологічні та серологічні дослідження в рамках дисертаційної роботи були виконані особисто в вірусологічній та генетичній лабораторіях кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Відбір хворих для проведення дослідження та взяття клінічного матеріалу проводилися спільно з к.мед.н., доцентом Н.С. Турчиною, доцентом кафедри неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Проведено особисто виділення ентеровірусів з сироваток крові хворих з ГПМК за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження та їх ідентифікація за допомогою реакції віруснейтралізації; проведено визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК; визначено присутність РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою ПЛР; проведено порівняльний серологічний аналіз у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння на вміст специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів за допомогою ІФА для визначення етіологічної ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Самостійно здійснено інформаційний пошук, проведено аналіз наукової літератури за проблемою, визначено адекватні завданням методи, виконано математичну обробку експериментальних даних, підготовку публікацій за результатами досліджень.

Планування напрямку роботи, визначення мети і завдань дослідження, аналіз результатів досліджень, їх узагальнення, інтерпретація, формування основних положень та висновків проведено спільно з науковим керівником: академіком НАН та НАМН України, доктором медичних наук, професором Широбоковим Володимиром Павловичем, завідувачем кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження і основні положення дисертації доповідались та обговорювались на науково-практичних форумах різних рівнів:

– *на міжнародному рівні*: на міжнародній науково-практичній конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві” (Одеса, 2013); міжнародній науковій конференції МКМ-2014-021 «Современные исследования медико-биологических наук» (Москва, 2014); на XIV міжнародній науковій конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих

навчальних закладів” (Київ, 2014); у матеріалах VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з’їзду Всеукраїнського лікарського товариства (Одеса, 2015).

Зміст дисертації обговорювався на нараді кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця 28.08.2018 р.

Публікації. Матеріали дисертації відображені у 12 наукових працях, зокрема в 8 статтях, з яких 5 – у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 стаття в іншому періодичному фаховому виданні, 2 статті в зарубіжних наукових журналах (1 у виданні бази SCOPUS), 3 – у тезах та матеріалах конференцій, з’їздів, конгресів. Матеріали дисертації відображені у 1 патенті на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, аналітичного огляду наукової літератури, програми, матеріалів і методів дослідження, розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури.

Дисертація викладена на 161 сторінках друкованого тексту (з них обсяг основного тексту – 117 сторінок), містить 17 таблиць, 10 рисунків. Бібліографія включає 289 джерел, з них вітчизняних – 141, зарубіжних – 148.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У *вступі* обґрунтовано актуальність дисертаційного дослідження, сформульовано мету та завдання, визначено об’єкт, предмет і методи дослідження, викладено наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, їх апробацію, особистий внесок здобувача та публікації.

У *першому розділі* «Роль ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу (огляд літератури)» на підставі вивчення та аналізу наукової літератури щодо сучасних поглядів на роль інфекції у етіопатогенезі гострого порушення мозкового кровообігу та встановленні значення ентеровірусів у виникненні та розвитку серцево-судинної патології показано, що ентеровіруси, які активно впливають на серцево-судинну систему, можуть бути активаторами патологічних процесів при різних формах серцево-судинної патології.

У *другому розділі* представлено програму, матеріали та методи дослідження. Для досягнення мети дослідження – вивчення ролі ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК, – було розроблено відповідну програму дослідження з використанням системного підходу. Програма передбачала сім організаційних етапів, результати кожного з яких ставали логічною підставою для вирішення завдань подальших етапів.

1. Аналіз наукових джерел щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань.

2. Виділення ентеровірусів за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження з сироваток крові хворих з ГПМК.

3. Ідентифікація ентеровірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК, за допомогою реакції віруснейтралізації.

4. Визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК.

5. Визначення присутності РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

6. Дослідження присутності специфічних імуноглобулінів М та G в парних сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

7. Проведення порівняльного аналізу результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння (пацієнти без судинної патології) для вивчення ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Робота виконувалась сумісно з кафедрою неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Молекулярно-генетичні, вірусологічні та серологічні дослідження проводили на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця.

До дослідження було залучено хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні та відділенні цереброваскулярної патології Олександрівської клінічної лікарні м. Києва в 2009-2016 роках. До основної групи увійшли 72 хворих з різними формами ГПМК. Групу порівняння у кількості 35 осіб склали хворі, які проходили стаціонарне лікування з приводу неврологічних хвороб, не пов’язаних з судинною патологією.

Виділення вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК, взятих у перші години після госпіталізації, проводили за допомогою класичного вірусологічного методу на трьох культурах клітин: RD; HEp-2 та HeLa. Для визначення типової належності виділених вірусів була використана реакція віруснейтралізації з типовими діагностичними ентеровірусними сироватками.

Дослідження біологічних властивостей виділених з сироватки крові хворих з ГПМК штамів вірусів проводили шляхом визначення їх генетичних маркерів, а саме: бентонітового маркера $A_{бент}$, що визначає ступінь афінітету до бентоніту; маркера S, що визначається за розміром вірусних бляшок під бентонітовим покриттям, та маркера rct_{40} (показник здатності вірусів до репродукції при температурі 40 °С).

З метою встановлення можливої наявності геному ентеровірусів в сироватках крові хворих з ГПМК було застосовано ПЛР у варіанті зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР).

Серологічне дослідження проводили методом ІФА з використанням тест-системи Enterovirus ELISA для визначення Ig M та Ig G в парних сироватках крові хворих основної та порівняльної груп.

Статистичну обробку проводили за допомогою стандартного пакету прикладних програм для медико-біологічних досліджень «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL.

Кількісну складову експериментальної частини дисертаційного дослідження подано в табл. 1.

Таблиця 1

Обсяг виконаної роботи

Задачі	Методи дослідження та оснащення	Кількісні показники
1	2	3
Аналіз наукових джерел щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань	Бібліосемантичний	289 джерел (вітчизняних – 141, зарубіжних – 148)
Виділення ентеровірусів з сироваток крові	Вірусологічний метод, з застосуванням культур клітин RD, HEp-2, HeLa	Сироватки крові 72 хворих основної групи та 35 осіб групи порівняння (107 сироваток)
Ідентифікація ентеровірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК	Реакція віруснейтралізації на культурі клітин HEp-2 з діагностичними сироватками до вірусів поліомієліту I-III типів, вірусів Коксакі В 1-6 типів та ECHO 1-34 типів виробництва НДІ поліомієліту і вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН, м. Москва.	11 штамів вірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК
Визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів	Визначення бентонітового маркера $A_{бент}$; виявлення ентеровірусних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S); визначення маркера rct_{40}.	
Визначення присутності РНК ентеровірусів у сироватках крові	ПЛР у варіанті зворотної транскрипції. Виділення ентеровірусної РНК за допомогою набору реагентів «РИБО-сорб» («Ампли-Сенс», РФ). Ампліфікація вірусної кДНК – на багатоканальному ампліфікаторі «Parkin Elmer 2400» (США) з застосуванням реактивів тест-системи «АмплиСенс Enterovirus-207».	Сироватки крові 72 хворих основної групи та 35 осіб групи порівняння (107 сироваток)

Продовження таблиці 1

1	2	3
Дослідження присутності специфічних Ig M та Ig G в парних сироватках крові хворих з ГПМК	ІФА (тест-система Enterovirus ELISA (Ig G Teskit / Ig A Teskit / Ig M Teskit) для визначення Ig M та Ig G до ентеровірусів (Sekisui Virotech GmbH, Німеччина); імуноферментний аналізатор HumaReader (“Human GmbH”, Germany)).	Парні сироватки крові 72 хворих основної та 35 осіб порівняльної груп (214 сироваток)
Порівняльний аналіз клініко-лабораторних результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння	Статистичний метод	107 історій хвороб (медична карта стаціонарного хворого, форма № 003/о)

Розроблена програма дослідження, обране методичне забезпечення та обсяги досліджень забезпечили вирішення поставлених завдань, отримання достовірних результатів, які стали основою для твердження про можливу тригерну роль ентеровірусної інфекції як пускового механізму ГПМК.

У третьому розділі «Використання вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного методів дослідження сироваток крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу з метою виявлення ентеровірусної інфекції» досліджено присутність ентеровірусів та їх РНК у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою ПЛР, застосування вірусологічного методу дослідження з метою виділення вірусних агентів та їх подальшої ідентифікації та вивчення генетичних маркерів, а також визначення специфічні Ig M та Ig G за допомогою ІФА.

За результатами власних досліджень було встановлено, що з сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділяються достовірно частіше, ніж у пацієнтів групи порівняння (23,6±5,9% та 2,9±2,8% відповідно, $p<0,05$) (табл. 2). З 17 ПЛР-позитивних сироваток крові хворих основної групи у 11 випадках було виділено ентеровіруси, які ідентифіковані як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4) та віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29), у трьох пробах виділений штам вірусу не вдалося ідентифікувати.

Таблиця 2

Виявлення геному ентеровірусів у сироватках крові осіб у основній та порівняльній групах

Результати молекулярно-генетичного дослідження	Результати			
	Число осіб основної групи		Число осіб групи порівняння	
	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
ПЛР +	17	23,6±5,1	1	2,9±2,8
ПЛР-	55	76,4± 5,1	34	97,1±2,8
Всього	72	100	35	100

Отже, з виділених ентеровірусів віруси Коксакі В склали 27%, віруси ЕСНО – 46% та неідентифіковані ентеровіруси – 27% (рис. 1).

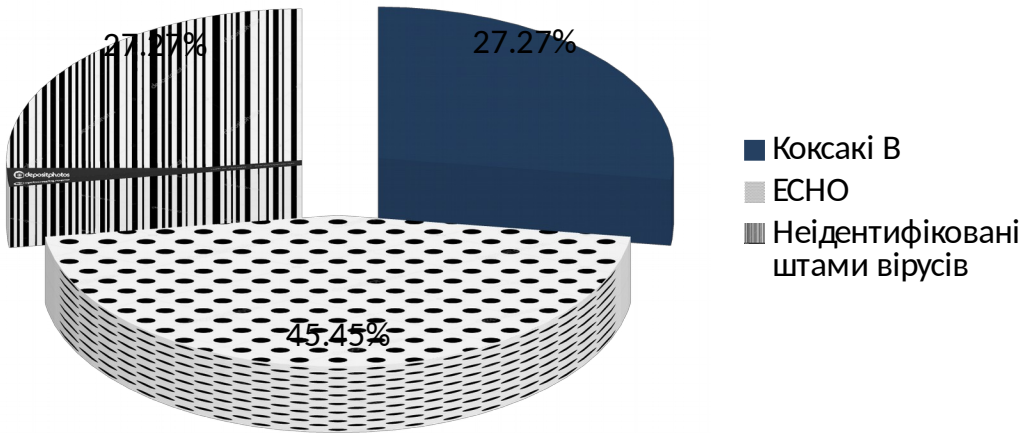

Рис. 1. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених з крові хворих на ГПМК.

Нами було вивчено генетичні маркери вірулентності виділених штамів ентеровірусів, які дозволяють встановити їх внутрішньотипові відмінності (табл. 3). Виявлена нами спільність ознак за генетичними маркерами виділених штамів ентеровірусів може свідчити про існування особливої групи ентеровірусів, які можуть відігравати роль тригерних факторів при ГПМК.

Таблиця 3

Генетичні маркери вірулентності вірусів, виділених з сироватки крові хворих з ГПМК

Виділений штам вірусу	Бентонітовий маркер Абент+ / Абент -	Маркер S («+» ; «-»)	Маркер t (rct40+ / rct40-)
Коксакі В2	Абент -	-	rct40+
Коксакі В3	Абент -	-	rct40+
Коксакі В4	Абент -	+	rct40+
ЕСНО 6	Абент -	-	rct40+
ЕСНО 9	Абент -	-	rct40+
ЕСНО 27 (1-й штам)	Абент -	-	rct40+
ЕСНО 27 (2-й штам)	Абент -	-	rct40+
ЕСНО 29	Абент -	+	rct40+
Неідентифікований 1	Абент -	-	rct40+
Неідентифікований 2	Абент -	+	rct40+
Неідентифікований 3	Абент +	-	rct40+

Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними маркерами: в усіх 11 ізолятів виявлено маркер rct_{40}+, у 10 з 11 ізолятів – бентонітовий маркер $А_{бент}$-. За маркером S вони різнились між собою: негативний маркер S мали 8 з 11 ізолятів (рис. 2).

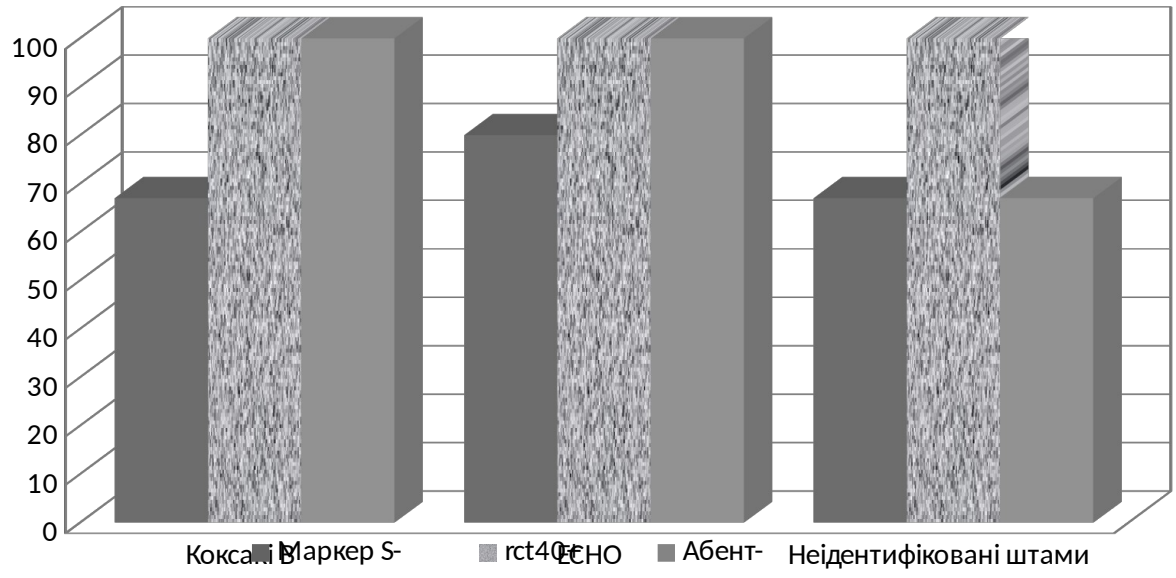

Рис. 2. Генетичні маркери ентеровірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК

На підставі отриманих результатів можемо зробити висновок про фенотипові характеристики виділених нами штамів ентеровірусів за генетичними

маркерами rct_{40}+, $А_{бент}$- та S-. Отже, для штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК, властиві наступні характеристики: здатність до репродукції при температурі 40 °С (позитивний маркер rct_{40+}), низький афінітет до бентоніту (маркер $А_{бент}$-) та утворення дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S-). Це дозволяє рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК (таблиця 4).

При аналізі результатів серологічного методу дослідження за допомогою ІФА в сироватках крові 17 хворих (23,6%) з 72 хворих основної групи та 2 хворих (5,7%) з 35 осіб групи порівняння було визначено специфічні Ig G до ентеровірусів.

У сироватках крові 10 хворих (13,9%) з 72 хворих основної групи було виявлено специфічні Ig M до ентеровірусів. Водночас, у жодного пацієнта з групи порівняння не було виявлено Ig M до ентеровірусів.

При співставленні результатів молекулярно-генетичного, вірусологічного та серологічного методів дослідження було визначено наявність лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції у 26 хворих (36,1%) з 72 хворих основної групи, а саме: у 6 хворих були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та було виявлено специфічний Ig M); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА визначені специфічні Ig G або Ig M та Ig G); у 9 хворих були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G в ІФА); у 3 хворих було виявлено лабораторні маркери персистуючої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G виявлено не було). У 46 хворих основної групи не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції.

Таблиця 4

Розподіл генетичних маркерів вірулентності ентеровірусів, виділених із сироваток крові хворих з ГПМК

Віруси	Кількість штамів	Кількість штамів з маркерами вірулентності		
		rct_{40+}	$А_{бент}$-	S-
Коксакі В	3	3	3	2
ЕСНО	5	5	5	4
Неідентифіковані штами вірусів	3	3	2	2
Всього	11	11	10	8

Лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені лише у 3-х осіб (8,6%) з 35 осіб групи порівняння, з яких 1 особа була ПЛР-позитивна, і у двох осіб було виявлено лише специфічні Ig G до ентеровірусів.

Наявність у хворих основної групи ознак як гострої, так і хронічної ентеровірусної інфекції, про що свідчить присутність специфічних Ig M та/або Ig G, виділення вірусів або їх геномів у сироватках крові цих хворих, свідчить про можливу тригерну роль як гострої, так і хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у патогенезі ГПМК.

Для діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК доцільно застосовувати поєднання класичного вірусологічного методу з виділенням та ідентифікацією вірусів, ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для визначення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів.

У четвертому розділі «Аналіз клініко-лабораторних даних хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу та лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції» проаналізовано вплив наявної ентеровірусної інфекції на перебіг захворювання та оцінку ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК. Для цього було проаналізовано клініко-лабораторні дані хворих основної групи, здійснено порівняльний аналіз цих даних з показниками у групі порівняння (табл. 5).

Таблиця 5

Порівняльна характеристика клінічного стану хворих основної групи з ознаками ентеровірусної інфекції та без них

Критерії оцінювання	Основна група (n=72)					
	1 підгрупа (n=6)	2 підгрупа (n=8)	3 підгрупа (n=9)	4 підгрупа (n=3)	5 підгрупа (n=46)	Разом (n=72)
	Абс (%) M ± m	Абс (%) M ± m	Абс (%) M ± m	Абс (%) M ± m	Абс (%) M ± m	Абс (%) M ± m
1	2	3	4	5	6	7
Вік хворих, роки	62,1±8,6	53,9±7,7	65,6±8,4	69,7±11,8	63,8±10,5	63,0±13,0
Стать: чоловіча, %	2 (33,3%)	2 (25,0%)	3 (33,3%)	1 (33,3%)	23 (50%)	31 (43,1%)
Жіноча, %	4 (66,7%)	6 (75,0%)	6 (66,7%)	2 (66,7%)	23 (50%)	41 (56,3%)
Тяжкість при госпіталізації, бали*	7,7±2,4	5,6±7,1	8,0±2,0	7,0±2,7	7,5±2,6	7,3±3,0
Тяжкість через 1 тиждень, бали*	6,0±3,9	2,5±2,1	5,1±3,0	5,3±2,2	4,8±3,1	4,6±3,6
ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів до ГПМК	5 (83,36%)	8 (100%)	5 (55,6%)	1 (33,3%)	22 (47,8%)	41 (56,9%)

Продовження таблиці 5

1	2	3	4	5	6	7
Паління	1 (16,7%)	1 (12,0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	13 (28,3%)	16 (22,2%)
Зловживання алкоголем	1 (16,7%)	1 (12,0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	8 (17,4%)	11 (15,2%)
Гіпертонічна хвороба	6 (100%)	7 (87,5%)	9 (100%)	3 (100%)	38 (82,6%)	63 (87,5%)
Надлишкова вага, кількість осіб	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (21,7%)	11 (15,3%)
Холестерин, ммоль/л	6,1±1,9	5,7±0,9	4,8±0,8	4,3±0,2	5,2±6,2	5,3±1,0
Смерть як наслідок, кількість осіб	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (6,5%)	4 (5,6%)
Рецидив ГПМК до/після	3 (50%)	2 (25%)	3 (33,3%)	1 (33,3%)	14 (30,4%)	23 (31,9%)

Примітка. * – за шкалою тяжкості інсульту Національних інститутів здоров’я США (NIHSS)

На підставі результатів вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного досліджень основну групу хворих з ГПМК було поділено на наступні підгрупи за наявними лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції.

До першої підгрупи увійшли 6 хворих з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА було виявлено специфічні Ig M. До другої підгрупи увійшли хворі з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА визначені лише специфічні Ig G або Ig M та Ig G (8 осіб). До третьої підгрупи увійшли 9 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами перенесеної ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G в ІФА. До четвертої підгрупи увійшли 3 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами персистуючої ентеровірусної інфекції, у сироватках крові яких було виявлено РНК ентеровірусів, але специфічних Ig M та Ig G до них виявлено не було. До п’ятої підгрупи увійшли 46 хворих з ГПМК, у яких не було виявлено лабораторні маркери ентеровірусної інфекції.

Встановлено, що середній вік хворих з ГПМК та лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції (ПЛР+ та серопозитивні за специфічними Ig M та/або Ig G), становив 53,9±7,7 роки, тоді як у хворих з

ГПМК без ознак ентеровірусної інфекції – 63,8±10,5 роки (p<0,05). Показано, що тяжкість перебігу ГПМК у хворих з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції (ПЛР-позитивних та серопозитивних за Ig M та Ig G) при госпіталізації та через тиждень становила 5,6±1,7 та 2,5±2,1 балів відповідно, що достовірно нижче (p<0,05), ніж у інших підгрупах хворих основної групи. Встановлено, що ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів (впродовж двох тижнів) до госпіталізації з приводу ГПМК було у 41 хворого основної групи (56,9%), зокрема у 100% хворих другої підгрупи (ПЛР-позитивні та серопозитивні за Ig M та Ig G) та у 83,3% хворих першої підгрупи (ПЛР-позитивні та серопозитивні за Ig M), що із врахуванням здатності ентеровірусів викликати респіраторні захворювання пояснює виявлення ентеровірусів з сироваток крові цих хворих у перший день госпіталізації. Натомість, у хворих 3-ї, 4-ї та 5-ї підгрупи ГРВІ в анамнезі було лише у 55,6%, 33,3% та 47,8% відповідно (p<0,05), що може слугувати підтвердженням ролі ентеровірусної інфекції як тригерного фактора у розвитку ГПМК.

За нашими даними, пік захворюваності на ГПМК серед пацієнтів основної групи припадав на квітень, жовтень та листопад. Звертає на себе увагу, що хворі з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції (виділення геному ентеровірусів з сироватки крові та/або виявлення Ig M та/або Ig G у діагностичних титрах) частіше хворіли з ГПМК також у жовтні, листопаді та квітні, що частково може пояснити весняно-осінню сезонність захворюваності на ГПМК (рис. 3).

Рис. 3. Сезонні коливання кількості хворих з ГПМК з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції та загальної кількості хворих з ГПМК

Отримані дані дозволяють припустити, що гостра або хронічна персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих з ГПМК може бути тригерним фактором у розвитку ГПМК.

У *розділі* «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» проаналізовані дані щодо тригерної ролі ентеровірусів у патогенезі ГПМК.

Результати даного дослідження демонструють перспективність використання молекулярно-генетичного методу для виявлення геному ентеровірусів у хворих з ГПМК. Для діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК доцільно застосовувати поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів. Перевагою застосування молекулярно-генетичного методу діагностики, зокрема, ПЛР перед вірусологічним є вища чутливість та специфічність методу, значна економія часу, можливість виявлення ентеровірусів, що не реплікуються у культурі клітин. Застосування вірусологічного методу діагностики та вивчення генетичних маркерів дозволяє проводити внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів та відібрати актуальні штами, перспективні для одержання вакцинних препаратів. У майбутньому швидка ідентифікація етіологічного агента дозволила б адекватно коригувати терапію і тим самим поліпшити перебіг захворювання та прогноз. В перспективі доцільно поставити на обговорення питання щодо профілактики ГПМК за допомогою вакцини на основі ентеровірусів, ізольованих від хворих з ГПМК.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на підставі власних комплексних досліджень вирішено актуальне науково-практичне завдання – встановлено тригерну роль ентеровірусів у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу на підставі визначення присутності ентеровірусів та їх геномів у сироватках крові у частки хворих з ГПМК та наявності специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у хворих з ГПМК; ідентифіковано серотипи виділених штамів ентеровірусів та вивчено їх генетичні маркери, обгрунтовано доцільність застосовування поєднання молекулярно-генетичного (ПЛР), вірусологічного та серологічного (ІФА) методів дослідження для доведення ролі ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

Основні результати дослідження наведені в наступних висновках:

1. Доведено, що з сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділяються достовірно частіше, ніж у пацієнтів групи порівняння (23,6±5,9% та 2,9±2,8% відповідно, $p<0,05$). З 17 ПЛР-позитивних сироваток крові хворих основної групи у 11 випадках ізольовано вірусні агенти, які ідентифіковано як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4), віруси ECHO (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29) та три неідентифікованих штами вірусів.

2. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками: в усіх 11 ізолятів виявлено маркер rct_{40}+, у 10 з 11 ізолятів – бентонітовий маркер $A_{бент}$-, прояв маркеру S- мали 8 з 11 ізолятів. Ці спільні ознаки можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі

ентеровірусів у розвитку ГПМК. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову і внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК.

3. На підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень показано, що лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені у 26 хворих (36,1%) з 72 хворих з ГПМК (основна група), а саме: у 6 хворих (перша підгрупа) були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig M у сироватках крові); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig G або Ig M та Ig G у сироватках крові); у 9 хворих (третя підгрупа) були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (не виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G до ентеровірусів); у 3 хворих (четверта підгрупа) було виявлено лабораторні маркери персистуючої ентеровірусної інфекції (виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів не виявлено). У 46 хворих (п’ята підгрупа) не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції. Лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені лише у 3-х осіб (8,6%) з 35 осіб групи порівняння, з яких 1 особа була ПЛР-позитивна, і у двох осіб було виявлено лише специфічні Ig G до ентеровірусів.

4. Встановлено, що середній вік хворих з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції становив 53,9±7,7 роки, тоді як у хворих без лабораторних маркерів ентеровірусої інфекції – 63,8±10,5 роки ($p<0,05$). Показано, що тяжкість перебігу ГПМК у хворих з лабораторними маркерами, що свідчать про загострення хронічної ентеровірусної інфекції, при госпіталізації та через тиждень становила 5,6±1,7 та 2,5±2,1 балів (за шкалою NIHSS) відповідно, що достовірно нижче, ніж у інших підгрупах хворих основної групи ($p<0,05$). Встановлено наявність ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів до госпіталізації з приводу ГПМК у 41 хворого основної групи (56,9%), зокрема у 100% хворих з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення та у 83,3% хворих з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції. Виявлено сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді.

5. Обгрунтовано необхідність поєднання класичного вірусологічного, молекулярно-генетичного і серологічного методів дослідження для виявлення ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати наукового дослідження довели, що ентеровірусні інфекції є важливим фактором ризику розвитку ГПМК. Для діагностики гострої та хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК

рекомендовано поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову і внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача)

У періодичних зарубіжних фахових виданнях:

1. The role of the persistent enterovirus infection in development of acute stroke / N.G. Andriushkova et al. // Wiadomosci Lekarskie. 2017. T. LXX, № 2. P. 187—191 (* накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
2. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Долинчук Л.В. Роль энтеровирусной инфекции в возникновении острого нарушения мозгового кровообращения // Современные исследования медико-биологических наук. Москва, 2014. С. 35—40 (* накопичення та обробка матеріалів, аналіз результатів).

У періодичних фахових виданнях, затверджених МОН України:

3. Андрюшкова Н.Г. Можливий етіопатогенетичний зв’язок між Коксаки В вірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу // Актуальные проблемы медицины и биологии. 2007. № 1. С. 88—97.
4. Андрюшкова Н.Г. Роль ентеровірусів в серцево-судинній патології // Медична наука України. 2015. Т. 11, № 1—2. С. 105—109.
5. Дослідження генома ентеровірусів у сироватці крові хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Український неврологічний журнал. 2016. № 3. С. 8—12 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
6. Геном ентеровірусів у сироватці крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медичні перспективи. 2016. Т. XXI, № 4. С. 33—38 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
7. Персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2016. № 4. С. 41—51 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
8. Кореляція між ентеровірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу на підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного методів дослідження / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2017. № 3—4. С. 38—45 (* накопичення та обробка матеріалів,

проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).

Патент:

9. Пат. 93020 UA. МПК A61B 5/00 (2014.01) Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Н.С. Турчина, Н.Г. Андрюшкова; заявник та патентовласник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. — № u 2014 04634; заявл. 30.04.2014 ; опубл. 10.09.2014, Бюл. № 17 (*накопичення та обробка матеріалів, аналіз результатів).

Опубліковані праці апробаційного характеру:

10. Андрюшкова Н.Г. Ентеровірусна інфекція як імовірна причина гострого порушення мозкового кровообігу // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві”, 27 грудня 2013 року. Одеса, 2013. С. 161—163.

11. Энтеровирусная инфекция, как возможный фактор риска развития острого нарушения мозгового кровообращения / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Унич П.П., Трепет Л.Н. // Матеріали XIV міжнародної наукової конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів”, 26 березня 2014 року. Київ, 2014. С. 18—22 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).

12. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С. Застосування полімеразно-ланцюгової реакції для визначення етіологічної ролі ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу // Матеріали VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з’їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 8-15 вересня 2015 р. Одеса, 2015. С. 336 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення молекулярно-генетичного методу дослідження, аналіз результатів).

АНОТАЦІЯ

Андрюшкова Н.Г. *Значення ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу. – Рукопис.*

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.06 “Вірусологія”. – ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України”, Київ, 2019.

Дисертація присвячена вивченню ролі ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК).

В результаті проведених експериментальних досліджень вперше було доведено, що з сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділялись достовірно частіше, ніж у пацієнтів групи порівняння (23,6±5,9% та 2,9±2,8% відповідно, $p<0,05$). З сироваток крові хворих з ГПМК виділено та

ідентифіковано штами ентеровірусів: Коксакі В (серотипи 2, 3, 4), віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29); три неідентифікованих штами. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними маркерами, які можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Виявлено присутність специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих основної групи. На підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень показано, що лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були у 26 хворих (36,1%) з 72 хворих з ГПМК.

Сформульовано припущення про персистуючий характер ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК. Визначено можливу тригерну роль гострої та персистуючої ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

За результатами роботи науково обґрунтовано необхідність поєднання класичного вірусологічного, молекулярно-генетичного і серологічного методів дослідження для виявлення ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

Ключові слова: ентеровіруси, гостре порушення мозкового кровообігу, персистенція, генетичні маркери, вірусологічний метод, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз.

АННОТАЦИЯ

Андрюшкова Н.Г. *Значение энтеровирусной инфекции в развитии острого нарушения мозгового кровообращения. – Рукопись.*

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.06 – “Вирусология”. – ГУ “Институт эпидемиологии инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского НАМН Украины”, Киев, 2019.

Диссертация посвящена изучению роли энтеровирусной инфекции у больных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК).

В результате анализа научной литературы показано, что энтеровирусы активно влияют на сердечно-сосудистую систему и могут быть активаторами патологических процессов при различных формах ОНМК как одной из форм сердечно-сосудистой патологии.

В ходе исследования были выделены энтеровирусы из сывороток крови больных с ОНМК при помощи классического вирусологического метода и идентифицированы при помощи реакции вируснейтрализации; определены генетические маркеры выделенных штаммов вирусов из сывороток крови больных с ОНМК; выявлено присутствие РНК энтеровирусов в сыворотках крови больных с ОНМК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР); проведен сравнительный серологический анализ у больных с ОНМК и лиц из группы сравнения на содержание специфических Ig M и Ig G к энтеровирусам при помощи ИФА для определения роли энтеровирусов в развитии ОНМК.

По результатам собственных исследований было установлено, что геномы энтеровирусов выделяются достоверно чаще из сывороток крови больных с ОНМК, чем у пациентов группы сравнения (23,6±5,9% и 2,9±2,8% соответственно, $p < 0,05$). Показано, что из 17 ПЦР-положительных сывороток крови больных основной группы в 11 случаях были выделены энтеровирусы, идентифицированные в реакции вируснейтрализации как вирусы Коксаки В (серотипы 2, 3, 4) и вирусы ECHO (серотипов 6, 9, 27 (два штаммы), 29), три выделенных штамма вирусов не удалось идентифицировать. Итак, из выделенных энтеровирусов вирусы Коксаки В составили 27%, вирусы ECHO – 46% и неидентифицированные энтеровирусы – 27%.

Установлено, что выделенные изоляты энтеровирусов характеризуются определенными генетическими маркерами: у всех 11 изолятов выявлен маркер rct40+, у 10 из 11 изолятов – бентонитовый маркер Абент-, проявление маркера S- имели 8 из 11 изолятов. Показано, что для штаммов энтеровирусов, ассоциированных с ОНМК, характерны: способность к репродукции при температуре 40 °С (положительный маркер rct40+), низкий аффинитет к бентониту (маркер Абент-) и образование мелких бляшек под бентонитовым покрытием (маркер S-). Это позволяет рекомендовать определение генетических маркеров для внутритиповой дифференциации энтеровирусов, выделенных из сывороток крови больных с ОНМК.

На основании результатов вирусологического, молекулярно-генетического и серологического исследований основная группа больных с ОНМК была разделена на следующие подгруппы по имеющимся лабораторным маркерам энтеровирусной инфекции. Показано, что у 6 больных по результатам ПЦР и/или вирусологического метода выявлялись энтеровирусы в сыворотках крови и специфические Ig M в ИФА, как лабораторные маркеры острой энтеровирусной инфекции. У 8 больных по результатам ПЦР и/или вирусологического метода выявлялись энтеровирусы в сыворотках крови, а также в ИФА определены специфические Ig G или Ig M и Ig G, являющиеся лабораторными маркерами хронической персистирующей энтеровирусной инфекции в стадии обострения. У 9 больных по результатам ПЦР и/или вирусологического метода не было обнаружено энтеровирусов в сыворотках крови, но обнаружены специфические Ig G в ИФА, как лабораторные маркеры перенесенной энтеровирусной инфекции. В сыворотках крови 3 больных была выявлена РНК энтеровирусов, но специфических Ig M и Ig G обнаружено не было, что свидетельствует о возможной персистирующей энтеровирусной инфекции. У 46 больных с ОНМК не было обнаружено лабораторных маркеров энтеровирусной инфекции.

Наличие у больных основной группы лабораторных маркеров как острой, так и хронической персистирующей энтеровирусной инфекции, о чем свидетельствует присутствие специфических Ig M и/или Ig G, выделение вирусов или их геномов в сыворотках крови этих больных свидетельствует о возможной триггерной роли как острой, так и хронической персистирующей энтеровирусной инфекции в развитии ОНМК.

Установлено, что средний возраст больных с лабораторными маркерами хронической персистирующей энтеровирусной инфекции составил 53,9±7,7 лет, тогда как у больных без лабораторных маркеров энтеровирусной инфекции – 63,8±10,5 лет ($p<0,05$). Показано, что тяжесть ОНМК у больных с лабораторными маркерами, свидетельствующими об обострении хронической энтеровирусной инфекции, при госпитализации и через неделю составила 5,6±1,7 и 2,5±2,1 баллов (по шкале NIHSS) соответственно, что достоверно меньше, чем у других больных основной группы ($p<0,05$). Установлено наличие ОРВИ в анамнезе за 1-14 дней до госпитализации по поводу ОНМК у 41 больного основной группы (56,9%), в том числе у 100% больных с лабораторными маркерами хронической энтеровирусной инфекции в стадии обострения и у 83,3% больных с лабораторными маркерами острой энтеровирусной инфекции. Выявлена сезонность выделения энтеровирусов от больных с ОНМК с пиками в апреле и октябре-ноябре.

Полученные результаты научного исследования доказали, что энтеровирусная инфекция является триггерным фактором в развитии ОНМК. Для диагностики острой и хронической персистирующей энтеровирусной инфекции у больных с ОНМК рекомендуется сочетание ПЦР для выявления геномов энтеровирусов и ИФА для выявления специфических Ig M и Ig G к энтеровирусам. Применение классического вирусологического метода диагностики с изучением генетических маркеров позволяет проводить внутритиповую дифференциацию выделенных штаммов энтеровирусов.

Ключевые слова: энтеровирусы, острое нарушение мозгового кровообращения, персистенция, генетические маркеры, вирусологический метод, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ.

SUMMARY

Andriushkova N.G. Role of enteroviral infection in development of acute cerebrovascular disease. – Manuscript.

The dissertation for the scientific degree of the Candidate of Medical Sciences (Ph.D.) in specialty 03.00.06 “Virology”. – State Institution “The L.V. Gromashevsky Institute of the Epidemiology and Infectious Diseases of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2019.

The dissertation is focused on research of the role of enteroviral infection in the development of acute cerebrovascular disease (ACVD).

By experimental research results it was established for the first time that the enteroviral genome was isolated reliably higher in the blood sera of patients with the ACVD of the main group than that of patients of the comparative group (23.6±5.9% and 2.9±2.8% respectively, $p<0,05$). The strains of enteroviruses: the Coxsackie-B viruses (serotypes 2, 3, 4) and the ECHO-viruses (serotypes 6, 9, 27 (two serotypes), 29) as well as three unidentified serotypes were isolated and identified in the blood of patients with the ACVD. It was established that enteroviruses’ isolates under research

have certain genetic features and they can be considered as auxiliary in research of the enteroviruses role in the ACVD development.

The presence of Ig M and Ig G, which were specific to enteroviruses, was established in the blood sera of patients of the main group. The assumption was made on the persistent character of the enteroviral infection of patients with the ACVD. The possible trigger role of the acute and persistent enteroviral infection in the ACVD development was determined.

The dissertation results show that the necessity of combination of the classic virology, molecular-genetic and serologic methods for isolation of enteroviral infection in patients with the ACVD was scientifically grounded.

Key words: enteroviruses, acute cerebrovascular disease, persistence, genetic markers, virology method, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АС	–	атеросклероз
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров’я
ГПМК	–	гостре порушення мозкового кровообігу
ЗТ-ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція у варіанті зворотньої транскрипції
ІФА	–	імуноферментний аналіз
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
$ТЦД_{50}$	–	доза, що викликає цитопатичну дію у 50% тест-культур клітин
ФР	–	фактори ризику
ЦПД	–	цитопатична дія вірусу
Ig	–	immunoglobulin
ECHO	–	Enteric Cytopathogenic Human Orphans viruses
EBV		Epstein-Barr virus
HeLa	–	клітини карциноми шийки матки людини
HEp-2	–	клітини – похідні епідермальної карциноми людини
RD	–	клітини рабдоміосаркоми людини