

УДК 578.826:616-07.004.12

Т. Д. УКБАЕВА, Л. М. МИХЕЕВА,
Л. Д. САДИБЕКОВА, Е. Т. АЙМУРЗАЕВА, С. Д. АЛИПБАЕВА

АДЕНОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ (ВОЗБУДИТЕЛЬ, СВОЙСТВА И ДИАГНОСТИКА)

(Научный центр гигиены и эпидемиологии им. Х. Жуматова)

Приведен обзор литературных данных по аденовирусам. Описаны физико-химические, биологические свойства аденовирусов человека. Дано морфологическое описание аденовирусного вириона. Описана сложная антигенная структура зрелого вируса. Для диагностики респираторных вирусных инфекций приведены современные методы исследования: метод антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ) и иммуноферментный анализ (ИФА). При исследовании аденовирусов описаны ускоренные методы диагностики: латекс-агглютинации, радиоиммунологический метод (РИМ).

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают ведущее место в инфекционной патологии человека как наиболее массовые, повсеместно распространенные, наносящие значительный экономический ущерб [1, 2]. Среди большой группы вирусов, которые их вызывают, самыми распространенными после гриппа считаются респираторно-синцициальный, парагриппозный, аденовирусы, коронавирусы, риновирусы, реовирусы и другие [3]. Полиэтиологичность этой группы заболеваний, нестойкость и строгая типоспецифичность иммунитета являются причинами частых повторных заболеваний детей, особенно младшего возраста. Они поражают все возрастные группы, характеризуются большим разнообразием клинических проявлений. Тем не менее каждая инфекция имеет свои особенности.

Аденовирусная инфекция, вызываемая обширной группой возбудителей, проникает в организм воздушно-капельным и алиментарным путями, а также через конъюнктиву глаз.

Аденовирусы (Ад) впервые выделены в 1953–1954 гг. американскими учеными Роу, Хьюбнером, Гильмором и др. из ткани оперативно удаленных аденоидов и миндалин у детей. При их культивировании обнаружили характерную, как бы спонтанно наступавшую дегенерацию, которая была связана с размножением в ней ранее неизвестных вирусов. Выделенные вирусы получили название «аденовирусы» от греческого слова *адено* – «железа». Позже было показано, что аналогичные возбудители присутствуют в большинстве удаленных хирургическим путем аденоидов и миндалин, а также в секретах из зева и конъюнктивы и в фекалиях больных,

страдающих неясными по своей этиологии острыми заболеваниями дыхательных путей и острыми фарингитами с конъюнктивитами [4].

В 1975 г. международным комитетом по таксономии вирусов (МКТВ) аденовирусы выделены в семейство *Adenoviridae*, состоящее из двух родов: *Mastadenovirus* (Ад млекопитающих) и *Aviadenovirus* (Ад птиц). В настоящее время семейство объединяет около 130 вирусов, выделенных от человека, млекопитающих и птиц, и несколько вероятных членов семейства вирусов, выделенных от холоднокровных животных [5]. Известные в настоящее время более 40 серотипов Ад человека выделены преимущественно от больных с ОРЗ разной тяжести, в случаях конъюнктивитов, тонзиллитов, гипертрофии миндалин и гастроэнтеритов [6]. Различные серотипы аденовирусов человека обозначались арабскими цифрами.

Морфология и биологические свойства аденовирусов. Аденовирусы представляют собой изометрические частицы в форме икосаэдра размером 70–90 нм. Молекулярная масса вириона $(170 - 175) \times 10^6$ мегадальтон. Оболочки нет. Капсид состоит из 252 капсомеров, из которых 12 вершинных имеют форму пентонов диаметром 8–9,5 нм, а 240 представлены гексонами 7–9 нм в поперечнике. Вершинные капсомеры имеют по 1–2 нитевидных выпячивания длиной 10–37 нм. Антигенная структура сложная: имеется примерно 7 структурных антигенов. Есть группоспецифический антиген, антигены, общие для небольших групп аденовирусов и индивидуальные для отдельных серотипов. Типоспецифические антигены расположены главным образом на поверхности вирионов. С гексонными кап-

сомерами связаны антигены, индуцирующие нейтрализующие антитела. Филаменты имеют гемагглютинирующие свойства. Вирусы стабильны при pH 6,0–9,0, быстро инактивируются при 56 °С, нечувствительны к жирорастворителям. Геном представлен двунитчатой ДНК в виде единичной линейной молекулы с молекулярной массой 20–30 мегадальтон; Г+Ц 48–61 %. Репликация и созревание вирионов происходят в ядре, где могут образовываться кристаллические скопления. Некоторые аденовирусы размножаются только в присутствии аденовирусов обезьян или вируса ОВ₄₀, с которым в лабораторных условиях даже получены стабильные гибриды. Аденовирусы обеспечивают условия для репликации вирусов аденосателлитов [7].

Установлено, что аденовирусы человека обладают следующими характерными свойствами:

1. Своеобразное цитопатогенное действие, проявляющееся в культурах ткани человека и млекопитающих.
2. Эпителiotропность.
3. Избыточное образование молочной кислоты в культурах зараженных ими клеток HeLa.
4. Локализация поражений в пределах ядра.
5. Базофильные внутриядерные включения.
6. Образование кристаллоподобных структур.
7. Общий комплементсвязывающий антиген.
8. Устойчивость к эфиру.
9. Апатогенность для лабораторных животных.
10. Отсутствие размножения в развивающихся куриных эмбрионах.

11. Строгое различие в реакции нейтрализации отдельных типов внутри группы аденовирусов [8].

«Эндемические» серотипы (1, 2, 5) широко распространены среди детей младшего возраста, тогда как «эпидемические» серотипы (3, 4, 7) встречаются чаще у детей более старшего возраста и у взрослых. Наиболее типичным клиническим синдромом является острый фебрильный фарингит, но у грудных детей в патогенный процесс могут быть вовлечены нижние дыхательные пути и развитие пневмонии иногда завершается летальным исходом [9].

При анализе очищенных препаратов аденовирусов установлено, что вирионы состоят только из одной молекулы ДНК и белка и не содержат РНК, свободных углеводов и липидов. Количество ДНК в аденовирусах разных типов колеблется в пределах 12–13 %. Вирусная частица содержит приблизительно 154×10^6 дальтон белка, что составляет

около 87 % сухого веса. Коэффициент седиментации аденовируса типа 2 равен 795 S, плавучая плотность в PbCl $1,34 \text{ г/см}^3$. Молекулярный вес, исходя из значения плотности вирусной частицы, равной $1,34 \text{ г/см}^3$ и средней величины 700 \AA составляет 145×10^6 дальтон.

ДНК аденовируса является двуспиральной молекулой, но по физико-химическим свойствам отличается от ДНК клеток, в которых репродуцируется вирус, и может быть отделена от нее при центрифугировании в градиенте плотности, хроматографии и колонках с метилированным альбумином и другими методами. Аденовирусная и клеточная ДНК отличаются по нуклеотидному составу. Обнаружена определенная корреляция между нуклеотидным составом ДНК аденовируса отдельных типов и степенью их онкогенности.

Плавучая плотность ДНК аденовирусов 2, 3, 7, 12, 18 составляет $1,708 - 1,714 \text{ г/см}^3$, причем для высокоонкогенных аденовирусов величина этого показателя меньше. В нейтральной среде константа седиментации ДНК аденовирусов типов 2, 5 и 7 равна 30,5 – 31 S.

Белки аденовирусов представлены структурными и растворимыми видами. К первым относятся белки капсида и внутренний, существование которого доказано в последние годы на модели аденовируса типа 5. Предполагают, что капсидные белки составляют не более 60 % белка вирионов. Один из белков капсида (основание пептона) обладает активностью фермента эндонуклеазы. Белок аденовируса по аминокислотному составу резко отличается от клеточного, но подобен у разных типов, включая онкогенные. Вирусный белок более богат аргенином и тирозином, а изолейцина и лизина в нем меньше [7].

Аденовирусы хорошо сохраняются при низких температурах, хорошо переносят многократное замораживание и оттаивание, устойчивы в широких пределах pH, но быстро отмирают при 50–60 °С. Однако есть некоторые отличия между отдельными серотипами.

Аденовирусы человека размножаются и накапливаются в высоком титре как в первичных культурах из различных тканей человека, так и в культурах перевиваемых линий эпителиальных клеток из нормальных тканей и опухолей человека. Эпителиальные клетки являются более чувствительными к вирусу, чем фибробласты. Это особенно отчетливо выявляется при размножении вируса в культуре кож-

но-мышечной ткани эмбриона человека, где есть оба типа клеток. Эпителиальные клетки поражаются раньше.

Размножение вируса в этих культурах сопровождается цитопатическим эффектом. Время появления клеточных изменений зависит от степени адаптации штамма и дозы заражения, в среднем через 24–96 ч [10].

В начальной стадии инфекции прикрепление вируса может происходить при температуре 0–4 °С, что было показано при смешивании высокоочищенных радиоактивных вирионов с концентрированными суспензиями клеток. Однако последующие стадии, проникновение и эклипс, не начинаются до тех пор, пока температура не будет повышена примерно до 37 °С. Возможно, посредством удлиненных нитей, отходящих от вершин вириона, вирус контактирует с участками присоединения на клеточной поверхности, так как рецепторные участки могут связывать очищенный антиген нитей аденовируса типа 2 и при этом инактивироваться им [11].

Вирионы прикрепляются фибрами к специфическим рецепторам клетки и проникают в них путем рецепторного эндоцитоза. Раздевание их начинается в цитоплазме и завершается в ядре. Конечным продуктом раздевания является ДНК, ассоциированная на 5'-концах с терминальными белками. Транскрипция генома осуществляется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой. В ранней стадии происходит лишь ограниченная транскрипция, которая идет на четырех отдельных участках генома, продуктами ее в основном являются иРНК, для неструктурных белков. Поздняя транскрипция идет в направлении, противоположном ранней транскрипции с образованием около 13 классов иРНК. Поздняя транскрипция происходит после синтеза вирусной ДНК и ее продуктами в основном являются иРНК для структурных белков.

Репликация ДНК происходит в ядрах и обеспечивается клеточными системами синтеза ДНК, а также вирусспецифическими ферментами – продуктами ранней транскрипции.

Сборка вирионов происходит в ядрах и является многоступенчатым процессом. Вначале полипептиды образуют мультимерные белковые структуры – фибры и гексоны, затем образуются капсиды и более крупные структуры – незрелые вирионы. Вирионы создают в ядре кристаллоподобные укладки. В ядре накапливаются и пустые капсиды, в которых нет сердцевины, а также вирионы с меньшим

количеством ДНК (неполные формы). Выход вирионов происходит при разрушении клетки. Каждая клетка способна продуцировать около миллиона вирусных частиц, однако лишь небольшое их количество выходит из клетки, а остальные остаются связанными с клеточными ядрами. В ядрах скапливаются вирусспецифические продукты, которые нарушают функцию ядра. В пораженной клетке появляются внутриядерные включения, она округляется и дегенерирует. Инфекционный цикл продолжается 14–24 ч. [12].

Диагностика. В последние годы разработаны новые методы, позволяющие обнаружить вирусный антиген непосредственно в секрете респираторных органов. Такие ускоренные методы диагностики обладают рядом преимуществ, из которых наиболее существенны следующие: 1) раннее распознавание природы вирусного заболевания может позволить предотвратить распространение вируса в доме или в клинике; 2) доказательство вирусной этиологии позволит избежать ненужного применения антибиотиков.

Методы ускоренной диагностики в настоящее время многочисленны, и необходима оценка их общей целесообразности при диагностике аденовирусной инфекции. В настоящее время существуют следующие методы ускоренной диагностики: электронная микроскопия, иммунофлуоресценция, различные ферментные методы, радиоиммунологический анализ, гемагглютинация и гемадсорбция (обычно в твердой фазе), а также методики определения специфических IgM [9].

Кроме того, в современных условиях требуется разработка и внедрение в практику новых чувствительных и высокоспецифичных методов диагностики респираторных инфекций.

Одним из методов, удовлетворяющим эти требования, может стать метод определения антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ). Появление АСЛ отражает, по существу, первый специфический этап иммунного ответа и поэтому служит удобным диагностическим критерием, особенно при решении задач ранней диагностики [13].

Другим важным преимуществом метода является то, что АСЛ не зависят от приема антибиотиков [14].

Показан простой и быстрый способ обнаружения аденовирусов типа 41 в материалах от больных. Метод основан на принципе латекс-агглютинации. Получены антитела к очищенным препаратам Ад-41.

Этими антителами сенсibilизировали гранулы активированного латекса, и полученные конъюгаты использовали для обнаружения Ад-41 в материалах (фекалиях) от больных. Показано, что этот метод характеризуется высокой чувствительностью, примерно в 5 раз превосходящей чувствительность метода иммунной электронной микроскопии. Метод высокоспецифичен – полученные диагностикумы практически не давали перекрестных реакций с аденовирусом 5 типа и совсем не реагировали с другими вирусами [15].

Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) основан на использовании антигенов или антител, меченных каким-либо ферментом (чаще всего пероксидазой или щелочной фосфатазой), и формировании специфических комплексов антиген–антитело на твердой фазе.

Разрешающая способность ИФА достаточно высока – с его помощью можно обнаружить аденовирусы при их концентрации менее 4 ед. ТЦД. При разработке методики выявления аденовируса в кале установлена возможность определения минимальных количеств аденовирусных антигенов – менее 1 мг в 1 мл. Однако при непосредственном исследовании загрязненного клинического материала ИФА может давать отрицательные результаты [16].

Достоинством ИФА также является возможность одновременного исследования большого количества клинического материала. Кроме того, ИФА позволяет проводить количественное определение вирусных антигенов. Моноклональные антитела к аденовирусу, используемые в методиках ИФА, достаточно специфичные, обеспечивающие высокую чувствительность и точность при идентификации вируса [17].

Важное место в диагностике аденовируса занимает радиоиммунологический метод (РИМ). К преимуществам РИМ относятся высокая чувствительность и специфичность, возможность стандартизации, получение результатов за 1–1,5 ч, возможность объективного учета результатов. РИМ также можно применять для быстрой идентификации выделенных штаммов вирусов. Однако, несмотря на важные преимущества, РИМ имеет существенные недостатки. Он требует специального режима работы и утилизации отходов, специальной дозиметрической аппаратуры, наличия дорогостоящих препаратов, достаточно очищенных препаратов вирусов и сывороток.

РИМ основан на определении количества меченого антигена до и после его контакта с гомоло-

гичными антителами, которые предварительно взаимодействовали с подлежащим выявлению меченым антигеном. Если последний по антигенной структуре соответствует меченому антигену, то часть или активные центры будут заблокированы этим неизвестным антигеном, а добавленный меченный антиген останется несвязанным или связанным частично, что и будет зарегистрировано радиометрически. Часто используют меченные антитела, так как их метка проще, чем метка антигена – прямой метод серодиагностики [18].

При сравнительной оценке РИМ, ИФА и метода флюоресцирующих антител (МФА) установлено полное совпадение результатов выявления аденовирусов в назофарингеальном отделяемом детей, больных ОРЗ. При этом РИМ позволил выявлять аденовирусные антигены даже в образцах, разведенных в 5–20 тыс. раз. С помощью РИМ можно выявлять некультивируемые аденовирусы при применении гипериммунной сыворотки против гексанового антигена аденовирусов [19].

При выделении цитопатогенного вируса в культуре ткани с последующим подтверждением принадлежности агента к роду аденовирусов с помощью реакции связывания комплемента (РСК) его серологический тип определяют с помощью РИ на культуре ткани.

Смесь 100 ТЦД 50 выделенного вируса с равным объемом типоспецифической сыворотки выдерживают 2 ч при комнатной температуре, а затем вносят в культуру ткани HeLa или Нер-2, которую инкубируют в течение 5–10 сут при 37 °С (до развития интенсивных цитопатогенных изменений в контрольных пробирках, где вирус не взаимодействовал с сывороткой). Изменения обнаруживаются через несколько дней после заражения культуры и характеризуются образованием гроздьевидных зон, округлившись дегенерированных клеток, длительно сохраняющих жизнеспособность, с выраженным закислением среды. Отсутствие изменений клеточного пласта в пробирках, где вирус был соединен со специфической сывороткой, указывает на принадлежность выделенного аденовируса к данному серотипу [20].

Ввиду большой трудоемкости реакции нейтрализации (РН) перед ее постановкой рекомендуется использовать для первоначального типирования выделенного аденовируса реакцию торможения геммагглютинации (РТГА) с эритроцитами обезьян и белых крыс, что позволит отнести аденовирус к одной

из четырех подгрупп и значительно уменьшит объем дальнейших исследований на культуре ткани [21].

Гемагглютинирующие антигены к любому изучаемому в реакции гемагглютинации (РГА) или РТГА серотипу аденовирусов готовят в культурах тканей, хорошо поддерживающих репродукцию этих возбудителей; Нер-2, HELa, почки эмбриона человека. Заражающая доза не должна быть большой, подбирать ее следует таким образом, чтобы интенсивная дегенерация клеток не развивалась ранее 3–4 сут. Тканевую жидкость собирают через 5–7 дней и после осветляющего центрифугирования при 1000–1200 об/мин (для осаждения остатков разрушенных клеток культуры) используют в качестве гемагглютинирующего антигена, хорошо сохраняющегося при 4 °С или в замороженном состоянии.

Кровь у обезьян, белых крыс или белых мышей собирают в консервант Альсера и хранят при 4 °С. Перед постановкой реакции эритроциты трехкратно отмывают изотоническим раствором NaCl и в нем же готовят 0,75% суспензию. На основании различий в способности аденовирусов агглютинировать эритроциты крыс и обезьян предложена система их предварительной дифференцировки на четыре отдельные подгруппы. В последнее время предложено заменить менее стабильные эритроциты крыс эритроцитами белых мышей [22].

Гемагглютинин аденовирусов типов 1, 6, 10, 11, 13, 19, 26 и 27 может быть отделен от вирусной частицы, а у типов 2, 4 и 5 связан с нитчатым антигеном и фактором, способствующим отщеплению клеток от стекла. Определение подгруппы выделенных штаммов аденовируса значительно облегчает их последующую серологическую идентификацию, резко уменьшает объем дальнейших исследований в РН, с соответствующими моновалентными сыворотками для завершающего типирования выделенных штаммов.

Определить серотип аденовируса, вызвавшего заболевание, в РТГА удается крайне редко, особенно при исследовании сывороток детей, у которых отмечается сероконверсия к гетерологичному типу аденовируса. При исследовании в РТГА сывороток взрослых наблюдают с такой же частотой, как и в РН, одновременное увеличение титров антител к двум и более серотипам, входящим в одну из четырех групп аденовирусов [23].

При аденовирусной инфекции РСК широко применяется как для идентификации аденовирусов, так и для выявления нарастания титров антител. РСК

значительно уступает по чувствительности РНГА, но превосходит РТГА [24]. Исследование парных сывороток больных острыми респираторными заболеваниями в РСК и РТГА показало, что при аденовирусных заболеваниях эти реакции в 2 раза эффективнее, чем выделение вируса в тканевых культурах [25].

Обычно РСК используют для первичной идентификации в культуре Нер-2 цитопатогенных агентов, тип которых определяют в РН. РСК по сравнению с РН позволяет получить результаты быстрее, не прибегая к помощи тканевых культур, и является более доступным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Укбаева Т.Д. Совершенствование иммунодиагностики респираторных вирусных инфекций: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Алма-Ата, 1991. 31 с.
2. Семенов Б. Ф., Гервазиева В. Б., Сверановская В. В. Распространенность и структура ОРВИ // ЖМЭИ. 2002. № 5. С. 54 – 59.
3. Горбунов С.Г., Горелов А.В., Косоротикова А. И. Этиологическая структура ОРВИ у детей, госпитализированных в стационар за 1981 – 1999 гг. // ЖМЭИ. 2001. № 6. С. 25-27.
4. Гайдамович С.Я., Жданов В.М. Классификация и номенклатура вирусов. М., 1980. 58 с.
5. Дяченко Н.С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л. Н. и др. Аденовирус, клетка, организм. Киев, 1988. 231 с.
6. Шувалова Е. П. Инфекционные болезни: Учебник. Ростов-на-Дону, 2001. 960 с.
7. Дяченко Н.С. Аденовирусы. Киев, 1974. 157с.
8. Дрейзин Р.С., Жданов В.М. Аденовирусные инфекции (этиология, клинико-эпидемиологические наблюдения, специфическая профилактика). М.: Медгиз, 1962. 288 с.
9. Вирусные респираторные заболевания: Доклад научной группы ВОЗ. Женева, 1981. 71 с.
10. Жданов В. М., Гайдамович С. Я. Вирусология. М., 1966. 480 с.
11. Букринская А.Г. Вирусология. М.: Медицина, 1986. 336 с.
12. Агола В.И. Биология вирусов животных. М.: Мир, 1977. 444 с.
13. Каральник Б. В., Березин В.Е., Денисова Т.Г. и др. Динамика содержания лимфоцитов с рецепторами к вирусу Sendai при иммунизации вирусом и иммуностимулирующим комплексом из его гликопротеидов // Изв. МОН РК, НАН РК. Сер. биол. и мед. 1999. № 3. С. 50 – 55.
14. Гнусарева Н.А., Дуйсенова Р.Д., Каральник Б.В. и др. Предварительная оценка эффективности диагностики активного туберкулеза по выявлению АСЛ // Проблемы туберкулеза. 2001. № 4. С. 41 - 42.
15. Takeshi S., Konki T., Memoru D., Key F. Detection of adenovirus type 41 in stool samples by a latex agglutination method // J. Immun. Meth. 1990. V. 127, N 2. P. 235 – 239.
16. Harmon M. W., Pawlik K. M. Enzyme immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens // J. Clin. Microbiol. 1983. V. 15, N 1. P. 5 -11.

17. Горбунов С.Г. Методы лабораторной диагностики респираторных инфекций у детей (сравнительный анализ) // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000. № 4. С. 53 - 54.

18. Смородицев А.А. Грипп и его профилактика. Л.: Медицина, 1984. 383 с.

19. Sarkkinen H.K., Halonen P., Arstila P.P. Comparison of fourlayer, radioimmunoassay and electromicroscopy for detection of human rotavirus // J. Med. Virol. 1979. V. 4. P. 255 - 260.

20. Перадзе Т.В., Халонен П. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. М.: Медицина, 1985. 300 с.

21. Злыдников Д.М., Смородицев А.А. Острые респираторные заболевания. Л.: Медицина, 1974. 260 с.

22. Matsumoto M., Nerome R. Hemagglutination test for adenoviruses using mouse erythrocytes // Arch. Virol. 1981. V. 67, N 2. P. 135 - 140.

23. Штильбанс Е.Б. Ранняя серодиагностика аденовирусной инфекции у детей // Проблемы гриппа и ОРЗ. Л., 1976. Т. 16. С. 79-84.

24. Гурьева Е. П., Юрлова Т.И., Гаева Л.Л. и др. Сопоставление эффективности вирусологического и серологического методов диагностики гриппоподобных ОРЗ // Проблемы гриппа и ОРЗ. Л., 1973. Т. 9. С. 100-103.

Резюме

Аденовирус коздырғышы туралы ғылыми әдбиеттерге талдау жасалған. Олардың физика-химиялық, биологиялық қасиеттері сипатталған. Аденовирус вириондарының және жетілген вирустың күрделі антигендік құрылымы көрсетілген. Респираторлық вирустарды анықтаудың жаңа диагностикалық әдістері: лимфоциттерді антиген байланыстырушы (ЛИАБ), иммундық ферменттік талдау (ИФТ), латекс-агглютинация, радиоиммунологиялық т. б. көрсетілген.

Summary

In this article the review of the literary data on the adenoviral problem is presented. Physical and chemical, biological properties of the human beings' adenoviruses are described. The morphological description of an adenoviral virion is given. Also, the complex antigenic structure of a mature virus is described. For diagnostics of the respiratory virus infections modern methods of research are resulted: a method of antigenbinding lymphocytes (ABL) detection and an enzyme immunoassay analysis (EIA). Also, at researches of adenoviruses some accelerated methods of diagnostics are used: latex-agglutination, a radioimmunological method.