

А.Г.Чучалин¹, Т.П.Оспельникова², Г.Л.Осипова¹, Н.В.Лизогуб¹, В.Б.Гервазиева³, В.З.Кривицкая⁴,
С.С.Григорян², С.А.Мазурина³, Е.Б.Файзулов³, А.А.Никонова³, В.Н.Панкратова², С.А.Гончарова²

Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы

1 – ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава, г. Москва;

2 – ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН;

3 – ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва.

4 – ГУ НИИ гриппа РАМН, г. Санкт-Петербург

A.G.Chuchalin, T.P.Ospelnikova, G.L.Osipova, N.V.Lizogub, V.B.Gervazieva, V.Z.Krivitskaya, S.S.Grigoryan, S.A.Mazurina, E.B.Faizuloev, A.A.Nikonova, V.N.Pankratova, S.A.Goncharova

A role of respiratory infections in exacerbations of asthma

Summary

Nineteen patients aged 18–65 years with moderate and severe exacerbations of atopic asthma were examined for respiratory viruses, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydothila pneumoniae*. Interferon system, IL-4 and γ -IFN serum levels were also investigated. Viral infections (RS-virus, adenovirus, influenza types A (H1N1, H3N2) and B viruses, parainfluenza types 1 and 3 viruses) were diagnosed serologically or using PCR with direct detection of viral nucleic acids in 73.6 % of the patients. Diagnostic level of *Mycoplasma pneumoniae* antigen was found in 78.9 % of the patients, anti-*Chlamydothila pneumoniae* antibodies were detected in 31.6 %. Leukocyte interferon-producing function was decreased in all the patients.

Резюме

У 19 пациентов в возрасте 18–65 лет с atopической бронхиальной астмой во время тяжелых и среднетяжелых обострений проведено обследование на наличие респираторных вирусов, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydothila pneumoniae*, оценены состояние системы интерферона, уровни IL-4 и γ -IFN в сыворотке крови. У 73,6 % пациентов серологически или путем прямого выявления вирусных нуклеиновых кислот методом ПЦР подтверждено наличие вирусной инфекции (респираторно-синцитиальный вирус — РС-вирус, аденовирус, грипп А (H1N1, H3N2) и В, парагрипп 1-го и 3-го типа). У 78,9 % пациентов в сыворотке крови обнаружен антиген *Mycoplasma pneumoniae* в диагностически значимом титре, у 31,6 % пациентов — антитела к *Chlamydothila pneumoniae*. У всех пациентов отмечено выраженное снижение интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов.

В России, согласно данным эпидемиологических исследований, бронхиальной астмой (БА) страдают около 7 млн человек (5 % взрослых и 9 % детей), из них примерно у 1 млн отмечается тяжелое течение заболевания [1]. Одной из основных причин, обуславливающей обострение БА и приводящей к ее утяжелению и развитию неконтролируемого течения, является наличие респираторных инфекций [2]. Изучение этой проблемы представляется важным направлением в пульмонологии.

Известно, что около 50 % обострений БА у детей и взрослых связаны с риновирусной инфекцией [3]. Обострению заболевания также способствуют вирусы гриппа А и В или их сочетание с парагриппозной и аденовирусной инфекцией. Традиционно большое значение в обострении БА придается и РС-вирусной (респираторно-синцитиальной) инфекции [4].

Репродукция вирусов в эпителиальных клетках респираторного тракта сопровождается выраженной гиперреактивностью бронхов и повышением проницаемости эпителия для аллергенов в просвете бронхов, приводящее в дальнейшем к аллергической реакции. Показано, что ОРВИ могут вызывать высокую продукцию IgE-антител [5, 6, 7].

Респираторные вирусы индуцируют выработку эпителиоцитами множества биологических медиаторов (IFN- α/β , ФНО- α , IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-11 и др.), оказывающих разнообразные воздействия, главными из которых являются запуск механизмов неспецифической резистентности, апоптоз инфицированных клеток, привлечение в очаги воспаления моноцитов / макрофагов, клеток лимфоцитарного и гранулоцитарного ряда и развитие специфического иммунного ответа [8].

Особое внимание в последние годы уделяется персистирующей вирусной инфекции в генезе хронического воспалительного процесса у больных БА, с которой связывают формирование стойкой гиперреактивности бронхов на фоне прогрессирующей иммунологической недостаточности. Как правило, у больных отмечаются низкие показатели Т-клеточного иммунитета, натуральной киллерной активности, продукции I и II типов интерферонов (IFN), фагоцитарной активности нейтрофилов [5, 9, 19]. Утяжелению БА на фоне ослабленного иммунитета способствует присоединение микоплазменной и хламидийной инфекции с развитием хронического деструктивного процесса дыхательных путей [10, 11].

Цель нашего исследования — выявление связи обострений БА с респираторными инфекциями вирусной и бактериальной природы и оценкой показателей интерферонового статуса и цитокинового профиля пациентов в период обострений БА.

Материалы и методы

В исследование было включено 19 пациентов, из них 12 женщин и 7 мужчин, в возрасте от 18 до 65 лет с atopической БА легкого и среднетяжелого течения в фазе тяжелого и среднетяжелого обострения, обусловленного острой респираторной инфекцией (ОРИ). Все они поступали на стационарное лечение в аллергологическое отделение ГКБ № 57 г. Москвы с ноября 2005 г. по март 2006 г.

У всех пациентов собирали анамнез заболевания, аллергологический анамнез, определяли общий анализ крови, при наличии мокроты выполняли общий ее анализ и посев на микрофлору с определением антибиотикограммы. Проводили спирографическое исследование, по показаниям — рентгенологическое исследование органов грудной клетки; ежедневно определяли утренние и вечерние показатели пиковой скорости выдоха (ПСВ) с помощью индивидуальных пикфлоуметров. На основании клинических данных, показателей ПСВ, данных спирографии, показателей сатурации кислорода устанавливали степень тяжести обострения БА по общепринятым критериям [1]. До поступления в стационар пациенты использовали топические стероиды и / или пролонгированные и короткодействующие β_2 -агонисты. В условиях стационара всем больным с обострениями БА средней и тяжелой степени проводилась терапия системными глюкокортикостероидами (ГКС).

У 13 пациентов (68 %) обострение БА началось в течение 1-й нед. ОРИ, и почти все они поступили в стационар в течение первых дней обострения. У них отмечались симптомы интоксикации, обусловленные ОРИ: субфебрильная или фебрильная лихорадка, головная боль, признаки ринита и фарингита. У 6 пациентов (32 %) тяжесть обострения БА нарастала постепенно. Несмотря на то, что они поступили в стационар через 2-4 нед. с момента первых проявлений ОРИ, у них сохранялись явления ринита и фарингита.

Забор крови у пациентов осуществляли в первые дни и через 2-3 нед. госпитализации. В парных сыворотках методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем ООО "Предприятия по производству диагностических препаратов" (г. Санкт-Петербург) проводили исследование уровня IgG-антител к вирусам гриппа А (H1N1, H3N2) и В, аденовирусу, РС-вирусу, вирусам парагриппа 1-го и 3-го типа и IgM к РС-вирусу. Увеличение оптической плотности (ОП) сыворотки в динамике заболевания на 0,3 ед. для IgG или больше 0,6 ед. для IgM считали диагностически достоверным. Мазки со слизистой носа и глотки на наличие вирусов гриппа

А, вирусов парагриппа 2-го и 3-го типов, РС-вирусов, риновирусов, аденовирусов исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 1) [12].

Для выявления антигенов *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке крови использовали реакцию агрегатгемагглютинации. За диагностический титр принимали положительный результат в разведении сыворотки 1 : 8, что соответствует 10^4 КОЕ/мл. С помощью реакции пассивной гемагглютинации определяли уровень антител к *M. pneumoniae* в парных сыворотках. Диагностически достоверным значением считали положительный результат в разведении сыворотки крови 1 : 32 [13].

Уровень антител IgG, IgA, IgM к *Chlamydia pneumoniae* в парных сыворотках определяли методом непрямой микроиммунофлюоресценции [13]. За диагностический титр при выявлении IgM принимали положительный результат в разведении сыворотки $\geq 1 : 8$, для IgG — $\geq 1 : 128$, для IgA — $\geq 1 : 8$. Для исключения перекрестных реакций в тех же сыворотках определяли спектр антител к *Chlamydia trachomatis*.

Общий и специфические IgE в сыворотке крови больных исследовали методом иммуно-флюоресцентного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства ООО "ЦКФФ" (г. Ставрополь).

Микрометодом в цельной гепаринизированной крови изучали показатели IFN-статуса: циркулирующий IFN, уровень продукции α -IFN лейкоцитами при стимуляции их вирусом болезни Ньюкасла по общепринятой методике, уровень продукции γ -IFN лимфоцитами при индукции их митогеном ФГА (*Difco*) в дозе 10 мкг/мл, уровень продукции спонтанного IFN *in vitro* [14].

Уровень IL-4 и IFN- γ в сыворотке крови исследовали методом ИФА с использованием тест-систем *ProCon* (г. Санкт-Петербург).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью методов описательной статистики, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, используя программу *Biostat*.



Рис. 1. Выявление РНК (ДНК) возбудителей респираторных инфекций методом ОТ и ПЦР (2%-ный агарозный гель)

Примечание: М — маркер веса ДНК. Вирусспецифические ПЦР-продукты, соответственно: 1 — респираторно-синцитиальный вирус, штамм Long (503 п. о.); 2 — вирус парагриппа 2-го типа (430 п. о.); 3 — вирус парагриппа 3-го типа (362 п. о.); 4 — риновирус 16-го типа (306 п. о.); 5 — вирус гриппа А, серотип H3N2, штамм Panama/2007/99 (231 п. о.); 6 — аденовирус 3-го типа (159 п. о.).

Результаты

Среди обследуемых с тяжелыми обострениями БА было 8 пациентов, со среднетяжелыми — 11. При среднетяжелых обострениях БА ПСВ и объем форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) составляли 50–80 %_{долж.}, насыщение крови кислородом (SpO₂) — 91–95 %. У больных с тяжелыми обострениями БА ПСВ и ОФВ₁ составляли меньше 50 %_{долж.} и SpO₂ — меньше 92 %.

Средний уровень общего IgE в сыворотке 19 больных составил 607,9 ± 173 кЕ/л при значениях нормы у взрослых ≤ 100 кЕ/л. У 18 пациентов выявили специфические IgE к домашней пыли, клещам домашней пыли, у 13 — к эпидермальным аллергенам, у 16 — к пылевцевым аллергенам, у 12 — к грибковым и у 11 — к микробным аллергенам. Как правило, у обследованных больных имела место полисенсibilизация.

По данным серологического исследования у 7 пациентов (36,8 %) выявили сероконверсию специфических IgG на вирусы гриппа А и В, РС-вирус, аденовирус, вирусы парагриппа 1-го и 3-го типов, в том числе у одного пациента — высокий уровень IgM к РС-вирусу. У 7 других пациентов (36,8 %) обнаружили прирост IgG, близкий к сероконверсии (около 0,25 ед. опт. пл.), к тому же спектру вирусов.

Таблица 1
Сероконверсия специфических IgG к респираторным вирусам и результаты исследования мазка со слизистой носа и носоглотки методом ПЦР на ДНК и РНК вирусов

№ пациента	Сероконверсия IgG	ПЦР
1	+ IA	-
2	+ RSV, ±ADV	+ ADV
3	± IB	-
4	-	-
5	+ IA	+ ADV
6	± PIV3	+ ADV
7	± PIV1	± ADV
8	-	-
9	-	-
10	± PIV3	-
11	-	-
12	± RSV, ± ADV	+ ADV
13	± IB	-
14	± IA	+ IA
15	-	-
16	+ IA	-
17	+ IB, + RSV, + PIV3, + PIV1	-
18	+ PIV1	-
19	+ ADV, ± IA	+ IA

Примечания: + — сероконверсия IgG; ± — прирост уровня IgG, близкий к сероконверсии; IA — вирус гриппа А; RSV — респираторно-синцитиальный вирус; ADV — аденовирус; IB — вирус гриппа В; PIV1 — вирус парагриппа 1-го типа; PIV3 — вирус парагриппа 3-го типа.

При исследовании мазков со слизистой носа и глотки методом ПЦР у 5 пациентов была выявлена ДНК аденовируса, у 2 — РНК вируса гриппа А. В общей сложности наличие вирусной инфекции, связанной по времени с обострением БА, подтверждено у 14 пациентов (73,6 %) (табл. 1).

У 15 из 19 обследованных пациентов (78,9 %) при исследовании парных сывороток выявили антигены *Mycoplasma pneumoniae* в диагностическом титре при наличии антител у 1/3 больных, что позволяет предполагать наличие у них как острой, так и хронической персистирующей микоплазменной инфекции.

При исследовании парных сывороток больных на антитела к *Chlamydomphila pneumoniae* у 6 пациентов были выявлены IgG и IgA в диагностическом титре при отсутствии IgM, что не исключает наличия у них персистирующей хламидийной инфекции. Антитела к *Chlamydia trachomatis* у них отсутствовали.

Между степенью тяжести обострений и числом выявленных у пациента острых респираторных инфекций была выявлена положительная корреляционная связь средней силы ($r = 0,64$). При тяжелых обострениях БА микст-инфекции отмечены у 87,5 % пациентов, при обострениях средней степени — у 63,6 %. Как правило, имели место вирусно-вирусные или вирусно-микоплазменные ассоциации. При тяжелых обострениях чаще сочетались парагриппозная или РС-вирусная инфекции с аденовирусной и микоплазменной.

У 13 пациентов провели бактериологическое исследование мокроты. Из них у 9 больных выделили *Streptococcus sp.* 10⁶-10⁷, *Candida sp.* 10³-10⁴, у 1 — *Streptococcus pn.* 10⁶, *Candida alb.* 10⁵, у 1 пациента — *Moraxella catarrhalis* 10⁶, у 2 пациентов — *E. coli* и *Staphylococcus aureus* в терапевтически незначимых концентрациях. *Streptococcus sp.* и *Moraxella catarrhalis* являются флорой верхних дыхательных путей. Не исключается контаминация мокроты этой флорой. Полученные данные имели бы большее диагностическое значение в случае выделения этих возбудителей из неконтаминированного транстрахеального аспирата.

При исследовании интерферонового статуса нами был выявлен выраженный дефицит α- и особенно γ-IFN-продуцирующей способности лейкоцитов у всех пациентов ($n = 19$). Продукция α-IFN соста-

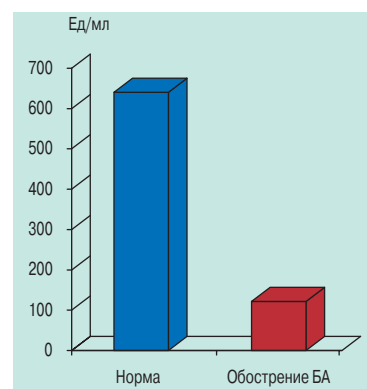


Рис. 2. Продукция α-интерферона лейкоцитами (Ед/мл)

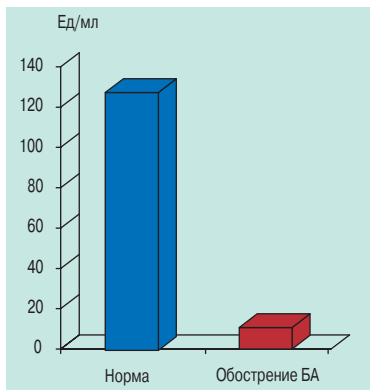


Рис. 3. Продукция γ -интерферона лейкоцитами (Ед/мл)

вила $121,6 \pm 19,53$ Ед/мл, γ -IFN — $10,74 \pm 1,77$ Ед/мл, что было в среднем ниже нормы в 5 и 11 раз соответственно (рис. 2 и 3). У 6 больных (31,5 %) выявлен спонтанный синтез IFN лейкоцитами в условиях *in vitro*. В норме спонтанная продукция IFN лейкоцитами у здоровых людей отсутствует. Его наличие у больных с обострениями БА косвенно указывает на вирусную / бактериальную инфекцию. Показатели сывороточного IFN были в пределах нормы ($< 2-8$ Ед/мл) за исключением данных одного пациента с клиникой тяжелой ОРВИ ($8-16$ Ед/мл).

Уровень IL-4 в среднем составил $12,85 \pm 0,01$ пкг/мл и не отличался в группах со среднетяжелым и тяжелым обострением. Лишь в одном случае при тяжелом обострении он достиг 322 пкг/мл. Уровень сывороточного γ -IFN в среднем составил $87,88 \pm 23,84$ пкг/мл.

Обсуждение

Прямые доказательства вовлечения вирусной инфекции в обострения БА были получены в исследовании, выявившем увеличение процента частоты ее обнаружения у данной группы больных [15, 16]. Нам также удалось подтвердить наличие вирусной инфекции при обострениях БА у 14 из 19 больных (73,6 %). У 15 пациентов (78,9 %) в сыворотке крови выявлены антигены *Mycoplasma pneumoniae*; антитела присутствовали у 5 из них, что свидетельствует об острой / хронической персистирующей микоплазменной инфекции. У 6 пациентов (31,6 %) не исключается персистирующая форма хламидийной инфекции. Отмечена положительная корреляционная связь средней силы между тяжестью обострения БА и количеством выявленных у пациента острых респираторных инфекций ($r = 0,64$). При тяжелых обострениях БА микст-инфекции выявлены у 87,5 % пациентов, при обострениях средней степени тяжести — у 63,6 %. Обнаружены вирусно-вирусные, вирусно-микоплазменные, вирусно-микоплазменно-хламидийные ассоциации. При тяжелых обострениях, как правило, сочетались парагриппозная или РС-вирусная инфекции с аденовирусной и микоплазменной.

Следует отметить (табл. 1), что у 10 пациентов гриппозная и парагриппозная инфекции, выявленные методом парных сывороток, не были подтверж-

дены при исследовании образцов методом ПЦР. Это, возможно, объясняется тем, что у данной группы больных, поступивших в клинику с обострением БА, острая фаза вирусной инфекции уже миновала. Известно, что наибольшей эффективности обнаружения вируса на поверхности слизистых методом ПЦР можно добиться, анализируя клинические образцы, полученные в первые дни после инфицирования, пока количество вируса не снижено под влиянием факторов противовирусного иммунитета. В то же время аденовирусы методом ПЦР выявлены у 5 пациентов (26,3 %), что может быть связано с характерной для аденовирусов длительной персистенцией в клетках эпителия дыхательных путей.

Антигены *Mycoplasma pneumoniae* в сыворотке крови у 15 и антитела к ним у 5 пациентов, вероятно, свидетельствуют об остром инфицировании микоплазмой или об обострении персистирующей микоплазменной инфекции. Антигены микоплазм могут длительное время выделяться в организме и поддерживать постоянный невысокий уровень синтеза специфических антител [10]. В экспериментах было установлено, что микоплазменные антигены в течение года сохраняются в органах иммуногенеза и, главным образом, в костном мозге, при этом наблюдается волнообразное поступление микоплазм в циркуляторное русло. Не исключено, что большую роль в обострении персистирующей микоплазменной инфекции играет острая вирусная инфекция [17].

То же самое можно сказать и о персистирующей хламидийной инфекции. Известно, что *S. pneumoniae* активно циркулирует в популяции, и более 60 % населения земного шара имеют антитела к этому патогену. К тому же характерной особенностью хламидийной инфекции является хронизация процесса. Механизмы выживания внутриклеточных бактерий при инфекции, а, следовательно, и персистенции, включают в себя и их способность регулировать процесс апоптоза, "отменяя" клеточную гибель, поддерживая жизнь клеток хозяина и тем самым способствуя и своему выживанию [18].

Выявленные нами респираторно-вирусные и вирусно-бактериальные инфекции у больных БА прежде всего сказываются на функционировании системы IFN — важнейшего звена неспецифической резистентности организма. Нарушения в системе интерферона, выявленные у обследованных, создают предпосылки для адгезии вирусов на слизистой дыхательных путей и бесконтрольного размножения их с поражением большого числа эпителиальных клеток, что приводит к развитию диффузного катарального воспаления слизистой оболочки бронхов, в том числе с явлениями бронхоконстрикции. Следует особо отметить, что применение системных ГКС у этих больных, снижая в целом воспалительный ответ дыхательных путей на вирусную инфекцию, вместе с тем приводит к снижению вирусного клиренса. Своевременное же назначенная терапия ОРВИ при БА может снизить размножение вирусов, сократить число

зараженных клеток органа-мишени и, таким образом, уменьшить распространенность и интенсивность воспаления слизистой оболочки дыхательных путей. В этой связи полезными могут оказаться индукторы IFN, такие как циклоферон, ларифан и кагоцел, которые имеют сродство к рецепторам альвеолярных макрофагов и вызывают продукцию IFN в легких [20]. Являясь препаратами широкого спектра действия в сочетании с иммуномодулирующим эффектом, они способны формировать резистентность организма к вирусам в течение длительного времени и могут быть включены в комплексную терапию больных БА, особенно в период обострений ОРВИ.

Литература

1. Чучалин А.Г. (ред.) Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Атмосфера; 2002.
2. Гервазиева В.Б., Сверановская В.В., Штерншиц Ю.А., Семенов Б.Ф. Роль респираторных вирусов в развитии аллергии. Цитокины и воспаление 2003; 2 (3): 3–8.
3. Johnston S. Experimental models of rhinovirus-induced exacerbations of asthma: where to know? Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 168: 1145–1146.
4. Juntti H., Kokkonen J., Dunder T. et al. Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. Allergy 2003; 58: 878–884.
5. Яковлева Н.В. Респираторные вирусы. В кн.: Федосеев Г.Б. (ред.). Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия. СПб.: Нордмед-Издат; 1998. 25–67.
6. Солдатов Д.Г. Клинико-патогенетические особенности течения бронхиальной астмы на фоне респираторной вирусной инфекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1991.
7. Штерншиц Ю.А., Лизогуб Н.В., Кривицкая В.З., Гервазиева В.Б. Острые респираторно-вирусные инфекции и бронхиальная астма. Инфекц. бол. 2006; 3: 18–21.
8. Message S.D., Johnston S.L. Host defense function of the airway epithelium in health and disease clinical background. J. Leukoc. Biol. 2004; 75: 5–17.
9. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы. М.; 2005. 39–89.
10. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Медицина; 1996.
11. Раковская И.В., Горина Л.Г., Утюшева М.Г. и др. Инфицированность микоплазмами детей, больных бронхиальной астмой. Журн. Микробиол. 2006; 4: 78–81.
12. Petitjean I., Vincent F., Le Moel G. et al. Chlamydia pneumoniae and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease or asthma in adults. In: Proceedings 4-th meeting of the European society for Chlamydia research. Helsinki; 2000. 285.
13. Никонова А.А., Файзулов Е.Б., Оксанич А.С. и др. Выявление респираторных вирусов человека в биологических образцах методом мультиплексной ПЦР. Актуал. вопр. эпидемиол. инфекц. бол. 2006; вып. 8: 737–741.
14. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. (ред.) Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина; 2005. 432–461.
15. Григорян С.С., Майоров М.А., Иванова А.М., Ершов Ф.И. Оценка интерферонового статуса по пробам цельной крови. Вопр. вирусол. 1988; 4: 433–436.
16. Message S.D., Johnston S.L. Viruses in asthma. Br. Med. Bull. 2002; 61: 29–43.
17. Хаитов М.Р. Роль респираторных вирусов в патогенезе бронхиальной астмы. Иммунология 2003; 1: 58–65.
18. Обгольц А.А. Существуют ли специализированные механизмы хранения антигена, переработанного макрофагами? Иммунология 1991; 5: 72–74.
19. Борцов П.А., Федина Е.Д., Токарская Е.А. и др. Регуляция хламидиями апоптоза клеток хозяина. Журн. микробиол. 2006; 4: 53–58.
20. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. М.; 1998.

Поступила 25.02.07
© Коллектив авторов, 2007
УДК 616.248-02:616.2-022