

*Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, С. К. Лозюк,
Ю. А. Шилова, З. Ф. Богуш, О. Н. Казинец,
А. С. Аринович, Е. П. Кишкурно,
Н. Л. Ключко, А. И. Гришель*

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КИШЕЧНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:
ЭТИОЛОГИЯ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА,
ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ
В 2015–2016 гг.**

*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии»*

Настоящая работа посвящена анализу результатов, осуществляемой в нашей стране диагностики вирусных ОГЭ, и изучению особенностей молекулярной эпидемиологии доминирующих возбудителей групповой заболеваемости.

Установлена частота выявления рота-, адено-, астро- и норовирусов у пациентов с вирусным острым гастроэнтеритом в целом по республике и на территории отдельных регионов. Изучена этиологическая структура и установлены доминирующие возбудители групповой заболеваемости в 2015–2016 гг., а также за весь период наблюдения с 2009 г. Показано, что основными этиологическими агентами групповой заболеваемости были норовирусы II генотипа, преобладающим генотипом – GII.4, а доминирующим этиологическим агентом групповой заболеваемости – генотип GII.17. Кинетика циркуляции норовирусов характеризовалась регулярной сменой доминирующих генотипов и геновариантов с периодом 2–3 года.

Полученные данные указывают на необходимость проведения дозорного эпидемиологического надзора за вирусными ОГЭ в рамках страны на основе использования оптимальных методов лабораторной диагностики и регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Ключевые слова: *острый гастроэнтерит, молекулярная эпидемиология, норовирусы, эпидемиологический надзор.*

*N. V. Paklonskaya, T. V. Amvosieva, S. K. Lozyuk,
Yu. A. Shilova, Z. F. Bogush, O. N. Kazinets, A. S. Arinovich,
E. P. Kishkurno, A. I. Grishel*

**ENTERIC VIRAL INFECTIONS IN 2015–2016 IN BELARUS:
ETIOLOGY, LABORATORY DIAGNOSIS,
MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF OUTBREAKS**

The purpose of this study was to analyze the results of the laboratory diagnosis of acute viral gastroenteritis, conducted in 2015–2016 and to study the molecular epidemiology of the predominant etiologic agents of outbreaks.

The article includes the results of virus (rota-, adeno-, astro- and noroviruses) detection in patients with acute viral gastroenteritis in the whole country and in the regions. Genogroup 2 noroviruses predominated during acute gastroenteritis outbreaks in 2015–2016, as well as for the entire observation period from 2009. The prevailing genotype of norovirus was genotype GII.4, and the predominant etiological agent of group morbidity was genotype GII.17. It was shown that the kinetics of noroviruses circulation among population was characterized by regular replacement of predominant genotypes every 2–3 years.

Obtained data led to conclusion about necessity of sentinel epidemiological surveillance within the country to develop the uniform optimal methods and unified approach to the laboratory diagnosis of acute viral gastroenteritis.

Keywords: *Acute gastroenteritis, molecular epidemiology, norovirus, epidemiological surveillance.*

К числу доминирующих возбудителей острого гастроэнтерита (ОГЭ) относится довольно широкий спектр агентов и среди них – рота-, норо-, адено-, астро-, энтеро-, саповирусы [1]. Несмотря на значительный прогресс в установлении этиологии кишечных инфекций, проблема качественной и своевременной диагностики этой группы заболеваний остается до конца нерешенной, что является основной причиной формирования так называемой группы острых кишечных инфекций (ОКИ) неустановленной этиологии. Вместе с тем, благодаря развитию и широкому внедрению молекулярных методов исследований, доля вирусных ОГЭ установленной этиологии за последние 15 лет увеличилась до 60–70 % всех вирусных ОКИ [1].

Целью настоящей работы был анализ результатов осуществляемой в нашей стране диагностики вирусных ОГЭ с последующим изучением особенностей молекулярной эпидемиологии доминирующих возбудителей групповой заболеваемости.

Материалы и методы. Изучение спектра возбудителей вирусных ОГЭ, структуры проводимых исследований и результатов их лабораторной диагностики проводили на основании отчетов опорных баз (лабораторий областных и Минского городского центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, инфекционных клиник), поступающих ежегодно в республиканскую референс-лабораторию по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Диагностику рота-, норо-, астро-, аденовирусной инфекции в республиканской референс-лаборатории осуществляли методами ИФА и ОТ-ПЦР. За 2015–2016 гг. в отношении ротавирусов и астровирусов было исследовано по 209 образцов фекалий, аденовирусов F – 226 образцов, норовирусов I и II геногрупп – 455 образцов, в том числе норовирусов I геногруппы – 120 образцов, норовирусов II геногруппы – 335 образцов.

Детекцию РНК норовирусов осуществляли методом ПЦР с использованием 2-х коммерческих тест-систем – «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» (производства «АмплиСенс», Россия) и «Тест-системы для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «НoV II-ПЦР» (производства РНПЦ эпидемиоло-

гии и микробиологии, Беларусь) в соответствии с инструкциями производителей.

Выявление антигенов норовирусов в фекалиях осуществляли методом ИФА с использованием тест-системы «Norovirus ELISA» (DRG Diagnostics, USA).

Генотипирование обнаруженных норовирусов проводили с помощью секвенирования. Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов [2, 3]. Реакцию секвенирования производили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США).

Молекулярное типирование осуществляли с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования в режиме онлайн [4].

Результаты и обсуждение. Анализ результатов лабораторной диагностики в целом по республике показал, что среди обнаруженных возбудителей вирусных ОГЭ доминировали ротавирусы (рис. 1), на втором месте по частоте обнаружения оказались аденовирусы (кишечные и респираторные), третье место по частоте выявления занимали норовирусы.

Анализ типовой принадлежности возбудителей ОГЭ по регионам республики показал, что имеется значительный разброс частоты обнаружения всех кишечных вирусов (рис. 2).

Анализ результатов этиологической структуры групповой заболеваемости в нашей стране за последние 9 лет (рис. 3, проанализировано 24 эпизода с 2009 по 2017 г.), свидетельствует о том, что доминирующими возбудителями были норовирусы II геногруппы. Результаты анализа групповой заболеваемости в 2015–2016 гг. также свидетельствовали о первостепенной роли норовирусов в ее формиро-

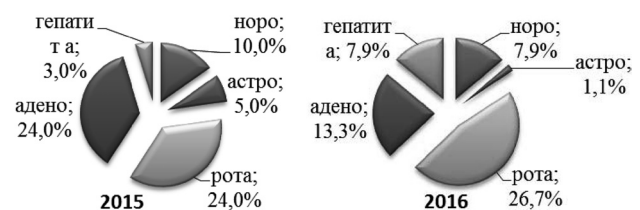


Рис. 1. Частота выявления различных возбудителей вирусных ОКИ установленной этиологии в 2015–2016 гг.

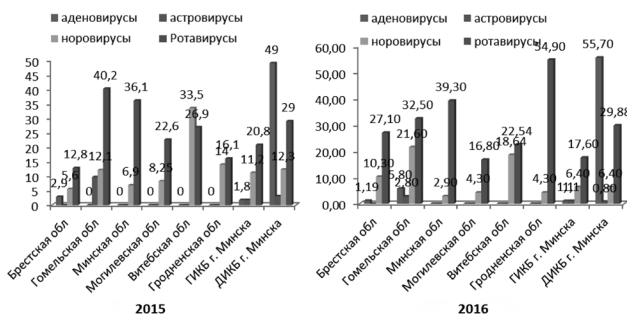


Рис. 2. Частота выявления основных групп кишечных вирусов в пробах пациентов с ОГЭ по регионам, 2015–2016 гг.

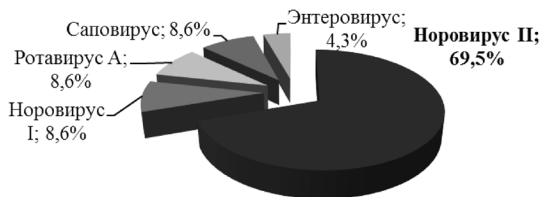


Рис. 3. Этиологическая структура групповой заболеваемости ОГЭ за период 2009–2016 г. и 6 месяцев 2017 г. по результатам РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

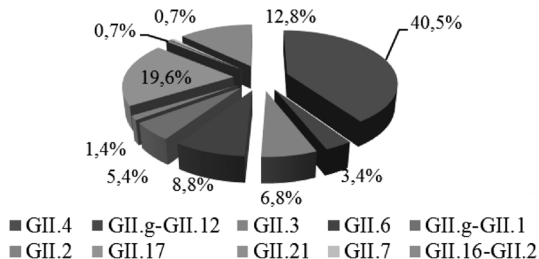


Рис. 4. Генотипическая структура норовирусов в Республике Беларусь, 2009–2017 гг.

вании: только 1 эпизод из 10 был вызван ротавирусами А, остальные 9 – норовирусами, причем 8 из 9 – норовирусами II геногруппы.

Общая генотипическая структура возбудителей норовирусной инфекции за весь период наблюдения представлена на рисунке 4.

Начиная с 2009 г. нами идентифицировано 10 различных генотипов норовирусов, доминирующим оказался генотип GII.4 (40,5 %), который с конца 90-х годов, преобладал во всем мире. По данным литературы вследствие чрезвычайно активной и широкой его циркуляции в глобальном масштабе имеет место постоянное появление новых эпидемических геновариантов данного генотипа, что сопровождается последующей сменой ранее циркулировавших [5]. Аналогичная ситуация наблюдалась и в нашей стране: начиная с 2009 г. уже зарегистрировано 5 различных геновариантов GII.4 (GII.4 2006b, GII.4 New Orleans, GII.e-GII.4 Sydney, GII.4 New Orleans-GII.4 Sydney, GII.16-GII.4 Sydney). Второе место в генотипической структуре по частоте встречаемости занимает новый генотип норовирусов GII.17, который появился на территории страны в конце 2015 г. и вызвал 6 эпизодов групповой заболеваемости. Он продолжал активно циркулировать вплоть до 2017 г. и в текущем году вызвал один эпизод групповой заболеваемости.

Следует заметить, что в разные годы регистрировался различный спектр генотипов и геновариантов норовирусов. На рисунке 5 представлено распределение различных генотипов и эпидемических геновариантов генотипа GII.4 по годам. Из рисунка видно, что в 2015–2016 гг. наблюдалось до-

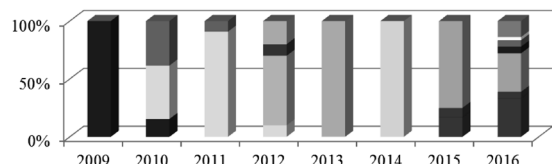


Рис. 5. Распределение доминирующих генотипов и геновариантов по годам, 2009–2016 гг.

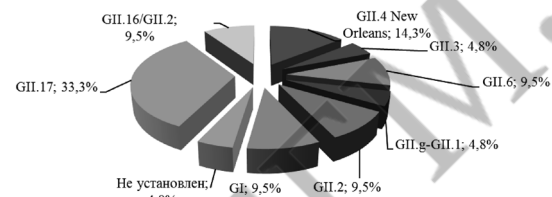


Рис. 6. Вклад различных генотипов и геновариантов в формирование групповой заболеваемости норовирусной инфекцией в 2009–2016 гг.

минирование двух генотипов норовирусов – GII.P17/GII.17 и GII.e-GII.4 Sydney.

Подавляющее большинство эпизодов групповой заболеваемости было связано с генотипом GII.17 (33,3 %), который появился на территории республики в 2015 г. Второе по значению место имел генотип GII.4 (геновариант New Orleans), ставший причиной 14,3 % эпизодов групповой заболеваемости. Равное количество эпизодов групповой заболеваемости было обусловлено генотипами GII.16/GII.2, GII.6, GII.g-GII.1 и норовирусами геногруппы GI (генотип GI.3) – по 9,5 % (рис. 6).

Объемы осуществляемых отечественной лабораторной службой диагностических исследований свидетельствуют о значимости и высокой актуальности проблемы вирусных ОГЭ в нашей стране. В настоящее время абсолютное их большинство направлено на выявление ротавирусов А. Исследования по детекции других потенциальных возбудителей (норо-, адено-, астровирусов и др.) осуществляются значительно реже, а в некоторых регионах – в единичных случаях, что может быть причиной искажения истинной этиологической структуры вирусных ОГЭ.

Несмотря на то, что в лабораторной диагностике ротавирусной инфекции ИФА является методом выбора, рекомендуемым ВОЗ [6], значительная доля ОГЭ может быть связана с другими этиологическими агентами (норо-, адено-, сапо- и астровирусами), для которых оптимальным методом и золотым стандартом диагностики является ПЦР [1]. При этом в нашей стране доля ПЦР исследований при установлении этиологии ОГЭ крайне невелика. Очевидно, что такой значительный перевес в сторону ИФА не позволяет рассчитать истинную этиологическую структуру вирусных ОГЭ.

Аденовирусы – достаточно часто встречающиеся этиологические агенты вирусных ОГЭ, доля которых в этиологической структуре колеблется от 1,5 до 20 %, составляя в среднем около 10–15 % [7]. Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что, в зависимости от региона и контингента обследуемых, в 2015–2016 гг. частота выявления аденовирусов в нашей стране составила от 1,1 до 55,7 %. Такие значительные различия могут объясняться как естественными причинами – у детей (особенно до 3 лет) аденовирусная инфекция встречается зна-

чительно чаще, чем у взрослых, так и различием в используемых методах диагностики, а также малым количеством выборки обследованных в каждом регионе. При этом следует иметь в виду, что ОГЭ вызывают, как правило, аденовирусы группы F, в которую входят аденовирусы 40 и 41 серотипов. С другой стороны, аденовирусы достаточно часто обнаруживаются в кишечнике в течение длительного времени после перенесенной респираторной инфекции, не связанной с ОГЭ. Может иметь место также бессимптомное носительство. Лабораторная диагностика, направленная на выявление только аденовирусов F, возможна методом ПЦР, тогда как при использовании других методов есть вероятность обнаружения аденовирусов других групп. Учитывая тот факт, что в представленных выше диагностических исследованиях на предмет детекции аденовирусов, применялись методы ИФА и выделение в культуре клеток, сделать однозначный вывод о том, что в анализируемых пробах присутствовали именно аденовирусы F, равно как и утверждать об их этиологической роли в ОГЭ, не представляется возможным.

Норовирусы являются вторыми по распространенности (после ротавирусов) этиологическими агентами ОГЭ у детей, и доминирующими – у взрослых [8]. Кроме того, норовирусы признаны наиболее частыми причинами групповой заболеваемости ОГЭ во всем мире. По данным настоящих исследований в 2015–2016 гг. они занимали 3-е место по частоте обнаружения, уступая рота- и аденовирусам. При этом среди этиологических агентов групповой заболеваемости норовирусы играли основную роль, как за весь период наблюдения с 2009 г., так и за последние 2 года (около 70 % всех расшифрованных эпизодов групповой заболеваемости). Относительно небольшая частота выявления норовирусов (до 5 %) у пациентов с ОГЭ в ряде областей обусловлена, по-видимому, использованием ИФА в качестве основного метода их лабораторной диагностики. Метод ИФА значительно уступает ПЦР по диагностической чувствительности в отношении норовирусов. Это связано с тем, что вследствие чрезвычайно высокого уровня генетической изменчивости [9], происходит постоянное появление их новых антигенных вариантов, которые не могут быть обнаружены в ИФА. Поэтому метод ПЦР является, безусловно, более предпочтительным в лабораторной диагностике норовирусной инфекции.

Анализ результатов молекулярно-эпидемиологического мониторинга за циркулирующей норовирусом позволил выявить ряд закономерностей в изменении генотипического пейзажа. В целом за период наблюдения имела место циркуляция 10 различных генотипов норовирусов II геногруппы (рис. 4), которая сопровождалась регулярной сменой доминирующих генотипов и геновариантов с периодом 2–3 года (рис. 5). В целом в генотипической структуре норовирусов преобладал генотип GII.4 (рис. 4), который на сегодняшний день признан доминирующим в мировом масштабе. Однако наибольшее количество эпизодов групповой заболеваемости было связано с генотипом GII.17 (рис. 6), который крайне редко регистрировался в мире до 2015 г. В конце 2014 г. в Китае появился новый геновариант этого генотипа, чрезвычайно быстро и широко распространившийся на территории других стран [10]. Именно он в 2015 г. он вызвал резкий рост групповой заболеваемости в нашей стране.

Анализ генетической структуры генотипа GII.4 позволил выявить его 5 геновариантов, циркулировавших в разное время, начиная с 2009 г. Причем формирование этих геновариантов происходило с участием как мутационной (генетический дрейф в результате накопления точечных мутаций в гене основного капсидного белка VP1), так и комбинативной (рекомбинация между различными генотипами) изменчивости. Результатом мутационной изменчивос-

ти стало появление новых геновариантов GII.4 2006b, GII.4 New Orleans, GII.4 Sydney, тогда как рекомбинация привела к появлению геновариантов GII.4 New Orleans-GII.4 Sydney и GII.16-GII.4 Sydney. Рекомбинантные геноварианты GII.4 были зарегистрированы в последние годы, что не сопровождалось их широким распространением и подъемом групповой заболеваемости. Их циркуляция не была уникальной для нашей страны, а регистрировалась в глобальном масштабе [5]. Кроме рекомбинантных геновариантов генотипа GII.4 в нашей стране в 2016 году появился рекомбинантный геновариант GII.16-GII.2, который вызвал 2 эпизода групповой заболеваемости.

Таким образом, на основании проведенного в настоящей работе анализа результатов диагностики вирусных ОГЭ в нашей стране можно обозначить ряд проблем. Так, в структуре проводимых исследований наблюдается значительное преобладание метода ИФА, который, будучи методом выбора при диагностике ротавирусной инфекции, не является оптимальным при выявлении инфекций, вызванных другими возбудителями. Вследствие этого, а также крайне ограниченное использование ПЦР в отдельных регионах приводит к серьезному дисбалансу полученных результатов и не способствует установлению реальной этиологической структуры вирусных ОГЭ в целом по республике.

Сложившаяся ситуация диктует необходимость организации и проведения в рамках страны дозорного эпидемиологического надзора за вирусными ОГЭ с использованием унифицированных и репрезентативных методов лабораторной диагностики для каждой группы инфекций, что будет способствовать получению достоверных результатов на достаточной выборке обследуемых пациентов с целью эффективного контроля за циркуляцией возбудителей, отслеживания появления их новых генотипов и геновариантов, прогноза развития эпидситуации и снижения заболеваемости.

Литература

1. *Viruses causing gastroenteritis* / I. Wilhelmi [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2003. – Vol. 9. – P. 247–262.
2. *International Collaborative Study To Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses* / J. Vinje [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, № 4. – P. 1423–1433.
3. *Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses* / S. Kojima [et al.] // J. Virol. Meth. – 2002. – Vol. 100. – P. 107–114.
4. *An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses* / A. Kroneman [et al.] // J. Clin. Virol. – 2011. – Vol. 51(2). – P. 121–125.
5. *Mechanisms of GII.4 norovirus evolution* / R. A. Bull, P. A. White // Trends Microbiol. – 2011. – Vol. 19. – P. 233–240.
6. *Manual of rotavirus detection and characterization methods* / World Health Organization. Dept. of Immunization, Vaccines and Biologicals. – Geneva: World Health Organization. – 2009. – 146 p.
7. *High frequency of cultivable human subgroup F adenoviruses in stool samples from a paediatric population admitted to hospital with acute gastroenteritis* / M. C. Arcangeletti [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 63(6). – P. 812–818.
8. *Norovirus* / E. Robilotti, S. Deresinski, B. A. Pinsky // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28. – P. 134–164.
9. *Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations* / Victoria M. [et al.] // J. Infect Genet Evol. – 2009. – Vol. 9(5). – P. 927–932.
10. *Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016* / M. C. W. Chan [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 23(8). – P. 1359–1354.

Поступила 7.08. 2017 г.