

Раздел V. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ОКИ И ТИПИРОВАНИЯ ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ МИНСКОГО РЕГИОНА

*Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Цеханович Н.С., Колесникова О.А.,
Шилова Ю.А., Лозюк С.К.,
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Беларусь, Минск*

В работе представлены результаты дозорного эпидемиологического слежения за возбудителями вирусных острых кишечных инфекций на примере Минского региона. За период с апреля 2018 года по апрель 2019 года была проведена генодиагностика 183 пациентов. Полученные результаты позволили установить вирусную этиологию заболевания у 32,8 % пациентов. Среди идентифицированных возбудителей вирусных ОКИ преобладали ротавирус А (36,6 %) и норовирус 2 геногруппы (35,0 %). Результаты молекулярного типирования позволили идентифицировать вирусы Коксаки В4, Коксаки В5, Коксаки А19, ЕСНО 7, норовирусы GII.Pe/GII.4и GII.P16/GII.2.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности и важности проведения дозорного эпидемиологического слежения за возбудителями вирусных ОКИ в нашей стране.

Ключевые слова: генодиагностика; этиология; ротавирус; норовирус; Коксаки.

PRACTICE OF APPLICATION OF MOLECULAR METHODS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF VIRAL ENTERIC INFECTIONS AND TYPING OF THEIR AGENTS ON THE EXAMPLE OF MINSK REGION

*Amvrosieva T.V., Paklonskaya N.V., Tsekhanovich N.S., Kolesnikova O.A.,
Shilova Y.A., Lozyuk S.K.
Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology
Belarus, Minsk*

The paper presents the results of a sentinel epidemiological surveillance of enteric viral infections in Minsk region since April 2018 to April 2019. During this period genodiagnosics was conducted for 183 patients. The obtained results allowed to establish the viral etiology of the disease in 32.8% of patients. Among the predominant causative agents of enteric viral infections were rotavirus A (36.6%)

and norovirus belonged to genogroup 2 (35.0%). The results of molecular typing allowed identifying Coxsackievirus B4, Coxsackievirus B5, Coxsackievirus A19, Echovirus 7, norovirus GII.Pe/GII.4 and GII.P16 / GII.2.

The results indicate a high efficiency and importance of a sentinel epidemiological surveillance of viral enteric pathogens in our country.

Key words: *genodiagnostics; etiology; rotavirus; norovirus; coxsackievirus.*

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют серьезную проблему для системы здравоохранения во всем мире. Причиной этому является чрезвычайно высокий уровень заболеваемости и смертности обусловленной этой патологией, в первую очередь среди детей. Так, в 2016 г. диарейные заболевания стали причиной более 1,6 миллиона смертей, в том числе около 500 тыс. смертей детей до 5 лет [1].

По современным данным на долю кишечных инфекций вирусной этиологии в настоящее время приходится до 75 % всех случаев ОКИ, регистрируемых в мире. Экономический ущерб, наносимый этой группой инфекций чрезвычайно высок вследствие их массовости и отсутствия эффективных мер профилактики и контроля. К числу доминирующих возбудителей ОКИ вирусной этиологии относится довольно широкий спектр патогенов и среди них – рота-, норо-, адено-, астро-, энтеро-, саповирусы [2]. Несмотря на значительный прогресс в установлении этиологии кишечных инфекций, проблема качественной и своевременной диагностики этой группы заболеваний остается до конца нерешенной.

В Республике Беларусь ежегодно регистрируется 12-14 тысяч случаев ОКИ, около 60% из них вызвано вирусными агентами, что обуславливает актуальную потребность отечественного здравоохранения в эффективных методах их диагностики. До настоящего времени в нашей стране основой лабораторной диагностики ОКИ оставались классические методы – ИФА, РИФ, выделение вирусов в культуре клеток. Несмотря на относительно небольшую стоимость, они имеют ряд недостатков, главными из которых являются низкая чувствительность и недостаточная специфичность, высокая трудоемкость исполнения, длительность получения результата. В сложившейся ситуации, диагностика в отношении почти четверти регистрируемых ОКИ оказывается неэффективной. С учетом зарубежного и нашего собственного опыта эффективность этиологической расшифровки ОКИ можно существенно увеличить (в 1,66 раза по данным McAuliffe с соавт., 2013,) в 1,7 раза – по данным Амвросьевой с соавт., 2012) в результате широкого внедрения в практику современных методов генодиагностики, направленных на выявление основных доминирующих в стране групп кишечных вирусов [3, 4].

В настоящее время в республике организовано дозорное эпидемиологическое слежение (ДЭС) за ОКИ, которое направлено на решение следующих задач: учет и анализ заболеваемости, мониторинг циркуляции

возбудителей, проведение оценки эпидемиологической ситуации, принятие мер, направленных на предотвращение распространения заболеваемости, своевременное выявление случаев, вызванных возбудителями с высоким эпидемическим потенциалом, организацию и проведение мероприятий по гигиеническому обучению и воспитанию населения по профилактике. В основу ДЭС положены методы генодиагностики и молекулярного типирования возбудителей – как наиболее эффективные и передовые на сегодняшний день.

Целью представленной работы было обобщение результатов использования методов генодиагностики и генотипирования в лабораторном слежении за возбудителями вирусных ОКИ на примере Минского региона.

Материалы и методы. Исследованию подлежали пробы биологического материала (фекалии), отобранные у лиц с ОКИ, госпитализированных в инфекционные больницы или инфекционные отделения больничных организаций здравоохранения Минской области. Пробы были отобраны как в рамках ДЭС за ОКИ, так и только по клиническим показаниям. Всего было исследовано 183 пробы фекалий от 183 пациентов.

Выявление РНК кишечных вирусов проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Амплификация выполнялась на Rotor-Gene 6000. Для работы использовались диагностические наборы производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии («Тест-система для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР», «Тест-система для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР») а также наборы реагентов АмплиСенс производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (РФ).

Молекулярное типирование энтеровирусов осуществляли на основании анализа нуклеотидной последовательности гена основного капсидного белка 7. Для молекулярного типирования норовирусов (НоВ) использовали фрагмент генома, включающий часть генов РНК-зависимой РНК-полимеразы и белка капсида. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [5]. Филогенетическую реконструкцию проводили методами присоединения соседей и максимального правдоподобия, статистическую достоверность топологии оценивали с помощью бутстреппинга (1000 псевдореplikатов). Компьютерный анализ последовательностей проводили с помощью программы MEGA версии 6.0 [6]. Молекулярное типирование НоВ выполняли в программе «Norovirus Genotyping Tool» [7].

Результаты и обсуждение. В результате выполненных в период с 01.04.2018 по 01.04.2019 на базе лаборатории вирусологических исследований и диагностики ВИЧ/СПИД лабораторного отдела ГУ «Минский облЦГЭОЗ» ПЦР исследований на предмет детекции ротавирусов группы А, норовирусов 2

генотипа, энтеровирусов, астровирусов 60 проб (32,8 %) оказались положительными. В 22 пробах была обнаружена РНК ротавирусов, в 21 – РНК норовирусов 2 генотипа, в 14 – РНК энтеровирусов, в 1 пробе – РНК астровирусов. В 2-х пробах была выявлена РНК как ротавирусов, так и энтеровирусов. Результаты этиологической структуры вирусных ОКИ у 60 обследованных пациентов представлены на рисунке 1.

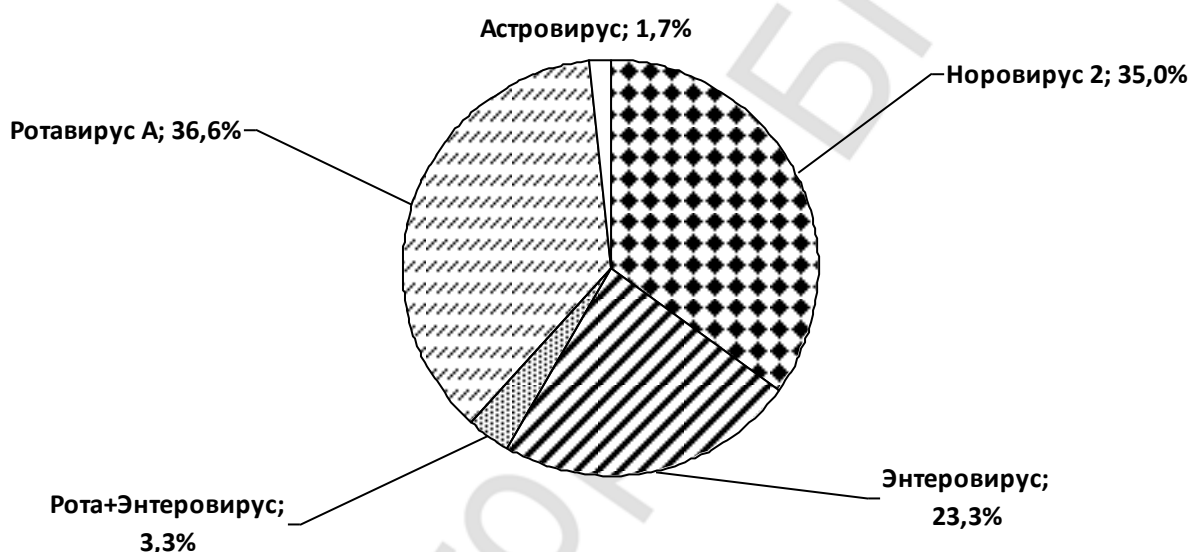


Рисунок 1. Этиологическая структура вирусных ОКИ у пациентов Минского региона

Анализ возрастной структуры пациентов показал, что чаще всего вирусные ОКИ выявлялись у детей 0–2 лет (21 пациент, 35 % от всех диагностированных), что является вполне закономерным. В этой возрастной группе с практически равной частотой обнаруживались ротавирусы А и энтеровирусы – 42,8 % и 38,0 %, соответственно. Норовирусы 2 геногруппы выявлялись значительно реже – всего у 19 % детей до 2 лет. В группе пациентов 3-6 лет этиологическая структура вирусных ОКИ была сходной: 40 % пациентов с ротавирусной инфекцией, 30 % – с энтеровирусной, у 20 % обнаруживались норовирусы 2 геногруппы и у 10 % – смешанная инфекция, вызванная ротавирусом А и энтеровирусом. У пациентов 7-14 лет также преобладали ротавирусы А (44 %), увеличилась доля норовирусов 2 геногруппы (22 %) и снизилась доля энтеровирусных гастроэнтеритов (11,1 %). В этой группе у одного пациента была диагностирована астровирусная инфекция и у одного – смешанная рота- и энтеровирусная. В возрастных

группах от 15 лет и старше наблюдалось выраженное изменение этиологической структуры вирусных ОКИ с преобладанием норовирусной инфекции. В целом в старших возрастных группах (n=20) норовирусы 2 геногруппы обнаруживались у 65 % пациентов с вирусной этиологией заболевания, ротавирусы А – у 25 %, энтеровирусы – у 10 %. Частота детекции различных возбудителей у пациентов разных возрастных групп представлена на рисунке 2.

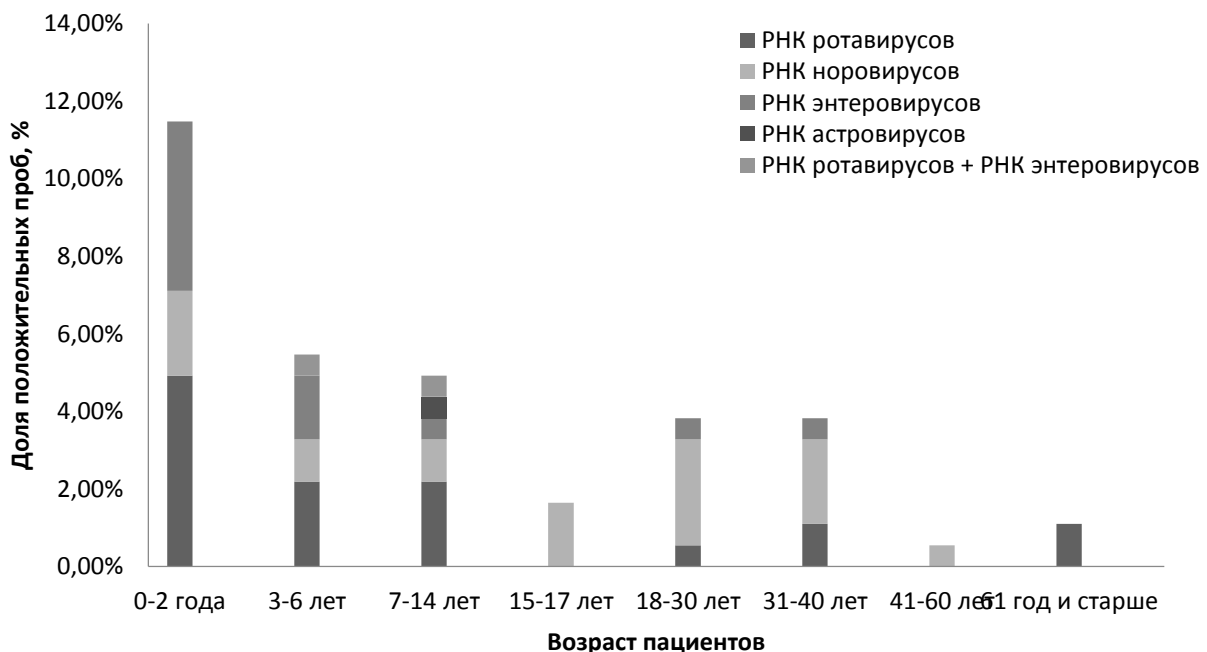


Рисунок 2. Частота выявления возбудителей вирусных ОКИ у пациентов разных возрастных групп

Очевидно, что представленные результаты являются предварительными, так как выборка пациентов с вирусными ОКИ сравнительно невелика (n=60). Кроме того, спектр диагностируемых возбудителей не включал ряд широко распространенных вирусных агентов – кишечные аденовирусы 40 и 41 типов, норовирусы 1 геногруппы и саповирусы. Тем не менее, из представленных данных видно, что ротавирусы доминируют у детей младшего возраста, а норовирусы 2 геногруппы являются преобладающими агентами вирусных ОКИ у взрослых и детей старше 15 лет. Астровирусы, входящие в состав широко используемых наборов для генодиагностики вирусных ОКИ, встречаются достаточно редко. При этом, значительную часть выявленных вирусных агентов у детей до 14 и, особенно, до 3 лет составляют энтеровирусы, которые не входят в состав наборов для генодиагностики вирусных ОКИ российских производителей. Полученные результаты указывают на необходимость

оптимизации средств генодиагностики этой группы инфекций с учетом преобладающих возбудителей.

Далее проводилось молекулярное типирование выявленных возбудителей (на базе Республиканской референс-лаборатории по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) с целью их идентификации до типа для оценки возможного эпидемического потенциала.

В результате выполненных исследований удалось идентифицировать 7 изолятов энтеровирусов и 4 изолята норовирусов 2 геногруппы. Так, обнаруженные у пациентов с ОКИ энтеровирусы принадлежали серотипам Коксаки В4 (3 изолята), Коксаки В5 (2 изолята), Коксаки А19 и ЕСНО 7 – по 1 изоляту. Следует отметить, что вирусы Коксаки доминировали в типовой структуре энтеровирусов в 2018 г., однако по сравнению с предшествующим годом их доля несколько снизилась.

Вирус Коксаки В4, который чаще всего обнаруживался у обследованных пациентов, в 2018 г. не входил в тройку доминирующих серотипов, но был достаточно широко распространен: на его долю в целом приходилось 8 % всех идентифицированных в Беларуси изолятов энтеровирусов. Изоляты, обнаруженные у пациентов с ОКИ на территории Минского региона, принадлежали к 2 различным геновариантам вируса, один из которых циркулировал и в других регионах республики, а другой – выявлялся только в Минском регионе. Оба этих геноварианта ранее не регистрировались в Беларуси.

Вирус Коксаки В5 в 2018 г. наиболее широко циркулировал среди населения (36 % всех идентифицированных изолятов, 1-е место по частоте обнаружения). Изоляты, обнаруженные у обследованных пациентов с ОКИ, принадлежали к 2 различным геновариантам вируса, которые циркулировали в 2018 г. на территории республики. Эти геноварианты входили в состав двух разных генетических линий вируса, которые регистрируются параллельно в течение всего периода наблюдения за энтеровирусами. Один из них продолжал циркулировать, начиная с 2016 г., второй – впервые был выявлен в Беларуси в 2018 г.

Обнаруженный в настоящем исследовании вирус Коксаки А19 относится к редко выявляемым серотипам, так как он не может быть выделен в культуре клеток и идентифицируется только методами молекулярного типирования. В базе данных GenBank содержится только 2 нуклеотидные последовательности вируса Коксаки А19, один из которых был зарегистрирован в 2013 г. в Нидерландах, другой – в 2014 г. в Тайланде. Изолят Коксаки А19, идентифицированный у пациента с ОКИ в Минском регионе обнаруживал 93–94 % сходства нуклеотидной последовательности с этими двумя изолятами.

Вирус ЕСНО 7 в 2018 г. возобновил циркуляцию после длительного перерыва (ранее был идентифицирован в 2014 г.). Изолят,

идентифицированный в Минском регионе, имел 98,3% сходства с вирусами, циркулировавшими в других регионах, и только 92,8% сходства с вирусами ЕСНО 7, циркулировавшими в 2014 г.

Результаты молекулярного типирования норовирусов 2 геногруппы, обнаруженных у пациентов с ОКИ в Минском регионе, показали, что они с равной частотой (50 % / 50 %) принадлежали к двум различным рекомбинантным генотипам норовируса: GII.Pe / GII.4 и GII.P16 / GII.2. Оба этих генотипа уже длительное время циркулируют на территории нашей страны. Генотип GII.Pe/GII.4 впервые был зарегистрирован в 2015 г. и с того времени продолжает циркуляцию, не вызывая существенных обострений эпидемиологической ситуации. Эпидемиологический потенциал этого генотипа, по-видимому, невысок, так как за весь период наблюдения он ни разу не был преобладающим. Генотип GII.P16/GII.2 впервые был зарегистрирован в 2016 г. Сразу после своего появления он вызвал несколько эпизодов групповой заболеваемости и значительное количество спорадических случаев ОКИ. Данный генотип доминировал среди возбудителей норовирусной инфекции в 2016 г. Однако, как показывают наши наблюдения, а также данные литературы, длительность циркуляции одного генотипа в популяции составляет 2–3 года. В 2018 г. генотип GII.P16/GII.2 существенно снизил интенсивность циркуляции по сравнению с 2016–2017 гг.: на его долю пришлось всего 6 % от всех идентифицированных норовирусов.

Результаты молекулярного типирования норовирусов 2 геногруппы позволяют объяснить относительно невысокую частоту встречаемости норовирусной инфекции у пациентов с ОКИ. В 2018 г. на территории Минского региона регистрировались преимущественно генотипы норовирусов, которые уже длительное время циркулировали среди населения, что позволило сформировать иммунный ответ у большей части человеческой популяции.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности и важности проведения ДЭС за возбудителями вирусных ОКИ в нашей стране. Продолжение данной работы и оптимизация проводимых исследований с учетом реального вклада более широкого спектра актуальных возбудителей в формирование заболеваемости вирусными диареями позволят значительно улучшить качество лабораторной диагностики этой группы социально значимых инфекций, установить причины, лежащие в основе регистрируемых эпидемиологических процессов и повысить качество надзора за кишечной инфекционной заболеваемостью в целом.

Список литературы

1. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / C. Troeger [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2018. – V. 18 (11). – P. 1211-1228.

2. Viral gastroenteritis / K. Bányai, M.K. Estes, V. Martella, U.D. Parashar // *Lancet*. – 2018. – V. 392 (10142). – P. 175-186.
3. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples / G.N. McAuliffe. [et al] // *J Infect.* – 2013. – V. 67(2). – P. 122-129.
4. Этиологическая структура вирусных острых кишечных инфекций в Республике Беларусь и генетическое разнообразие их возбудителей / Т.В. Амвросьева [и др.] // *Медицина*. – 2013. – № 4. – С. 26-32.
5. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 215. – P. 403-410.
6. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / T. Koichiro [et al.] // *Molec. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2725-2729.
7. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses / A. Kroneman [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2011. – Vol. 51, N 2. – P. 121-125.