

© Виноград Н.О., Юрченко О.О., Дубіна Д.О., 2013
 УДК 616.9:578.833.1/.2:911.375.227(477.7)

Н.О. Виноград, О.О. Юрченко, Д.О. Дубіна

АРБОВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОГО ПРИЧОРНОМОР'Я

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
 Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова МОЗ України



Вивчено розповсюдженість арбовірусних інфекцій в природних осередках і серед населення Північно-Західного Причорномор'я (ПЗП). Встановлено рівні специфічного імунітету населення як об'єктивні лабораторні показники інтенсивності циркуляції арбовірусів серед жителів регіону. Виявлено випадки захворювань людей на гарячку Західного Нілу (ГЗН) і вірусний кліщовий енцефаліт (ВКЕ) при обстеженні хворих на сезонні гарячкові стани нез'ясованої етіології. Визначено видовий склад членистоногих і птахів, що забезпечують циркуляцію вірусів кліщового енцефаліту, Західного Нілу, Сіндбіс, Укунієм і природних осередках, оцінено епідеміологічний потенціал біотичних об'єктів за показниками вірусофорності векторів та виявлення антигенів/РНК вірусів у пробах від хребетних. Доведено циркуляцію у Північно-Західному Причорномор'ї європейського (західного) генотипу вірусу кліщового енцефаліту, проведено аналіз амінокислотних послідовностей, що виявив наявність чотирьох маркерних амінокислотних заміщень – 67(N), 266(R), 306(V) і 407(R), у доменах II і III ектодомену і трансмембранному сегменті білка оболонки E.

Ключові слова: арбовірусні інфекції, Північно-Західне Причорномор'я, імунітет.

В останні роки в Європі спостерігається зміна меж природних осередків трансмісивних особливо небезпечних інфекцій (ОНІ), зростає рівень захворюваності населення на арбовірусні інфекції, у тому числі збільшується частка тяжких клінічних форм і летальних завершень [1-3].

Цьому сприяють кліматичні, екологічні та соціально-політичні зміни, зокрема потепління, антропогенна трансформація довкілля, інтенсивний розвиток міжнародних транспортних сполучень і туризму тощо. Зростає загроза використання арбовірусів для створення штучного епідемічного процесу (біотерористичних атак), що також обумовлює необхідність оптимізації системи реагування на біологічні загрози, у тому числі моніторингу циркуляції цих патогенних біологічних агентів (ПБА) [4-6].

Розмаїття ландшафтних і кліматичних зон в Україні зумовлює суттєві відмінності в спектрі ендемічних природно-осередкових ПБА у різних регіонах. Нами проведені багаторічні дослідження у ПЗП для з'ясування структури і особливостей функціонування природних осередків арбовірусних інфекцій для визначення їх медико-соціального значення на сучасному етапі.

Регіон дослідження включав чотири адміністративні території (АР Крим, Одеську, Миколаївську і Херсонську області) і просторово розташовувався у трьох ландшафтних зонах – лісостеп, степ і гірський Крим. Розмаїття фауни ссавців, птахів, комарів і кліщів, а також потужні трансконтинентальні міграційні коридори птахів є біологічним підґрунтям формування багатокомпонентних природних осередків ендемічних та екзотичних природно-осередкових інфекцій [7-9].

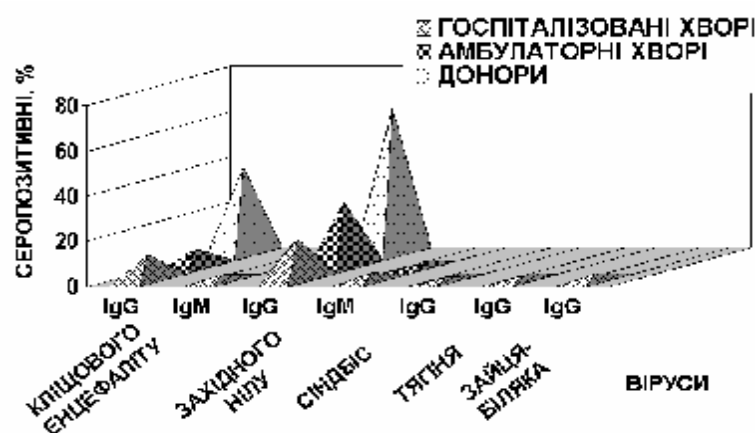
Для вивчення розповсюдженості арбовірусів у природних осередках і серед населення ПЗП матеріал із біотичних об'єктів довкілля (кліщі, комарі, птахи, ссавці) і сироватки крові людей, отримані впродовж 2000-2007 рр., досліджували з

ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

використанням комплексу вірусологічних, молекулярно-генетичних (зворотна транскрипція і полімеразна ланцюгова реакція – ЗТ-ПЛР) і серологічних (реакція гальмування гемаглютинації – РГГА, реакція непрямой гемаглютинації – РНГА та імуноферментний аналіз – ІФА) методів. Усього було досліджено 12205 екземплярів (670 пулів) кліщів, 30739 екземплярів (434 пули) комарів, матеріал від 359 птахів і 6 ссавців, 813 сироваток крові людей (84 – від здорових, 320 – від амбулаторних та 409 – від госпіталізованих хворих). Генетичні особливості популяції вірусів ВКЕ ПЗП вивчали шляхом секвенування нуклеотидних послідовностей гену білка оболонки Е семи штамів вірусу ВКЕ 80, 85, 150, 70, 120, 290 і Саврань 160, ізольованих із іксодових кліщів в АР Крим, Одеській і Херсонській областях в 1988-1990 роках, із колекції вірусів ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова МОЗ України».

Визначення спектру та інтенсивність розповсюдження арбовірусів серед населення ПЗП проводили за стандартами госпітального нагляду і когортних досліджень. Серологічне обстеження різних груп населення свідчило про активну циркуляцію вірусів ВКЕ і ГЗН. Специфічні антитіла до цих флавівірусів знайдено як при визначенні рівня популяційного імунітету при когортних дослідженнях сироваток крові донорів, так і при госпітальному нагляді за амбулаторними і госпіталізованими гарячковими хворими. Так, антитіла до вірусу ГЗН були визначені у 18,58-28,75 % обстежених сироваток крові донорів, а рівні серопозитивності до вірусу ВКЕ коливалися в межах 8,25-11,17 % обстежених взірців.

У поодиноких випадках у хворих знайдено антитіла до вірусів Сіндбіс, Тягіня і зайця-біляка (мал. 1). Антитіла до вірусів ККГГ, Укуніємі та Батаї в жодній з обстежених груп не зареєстровано.



Мал. 1. Спектр антитіл до арбовірусів у населення Північно-Західного Причорномор'я (за даними ІФА).

Виявлення імуноглобулінів класів IgG і IgM дозволило диференціювати гострі арбовірусні інфекції від ретроспективних анамнестичних випадків. За даними серологічних обстежень амбулаторних і госпіталізованих інфекційних хворих було виявлено один випадок ВКЕ і 33 – ГЗН.

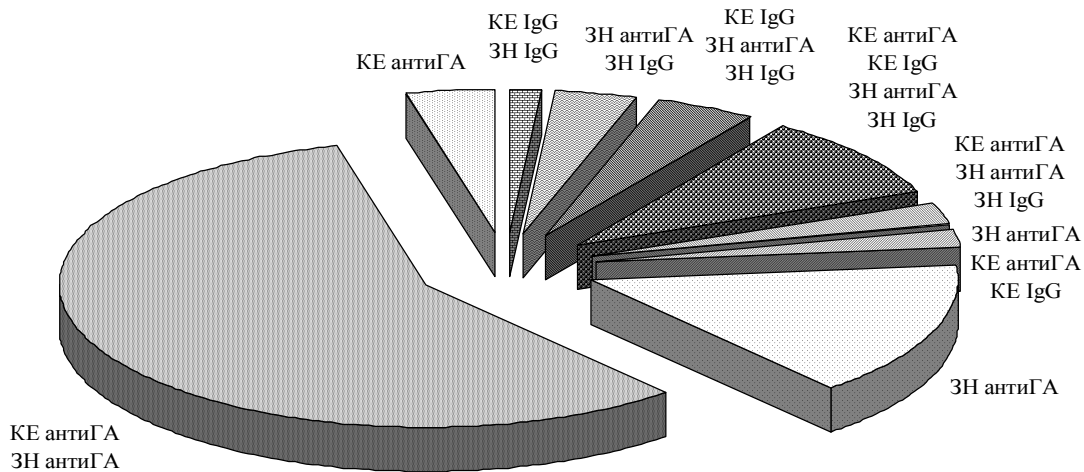
Клінічно ГЗН маніфестувала у 2/3 випадків ураження ЦНС, а решта – лише як гарячковий стан нез'ясованого ґенезу. Вік хворих коливався від 3 місяців до 75 років, але більша частина захворювань спостерігалася серед осіб віком від 35 до 48 років. Серед хворих переважали міські жителі, які проживали у м. Одесі. Різниці між частотою захворювань серед жінок і чоловіків не виявлено.

Переважали спорадичні випадки захворювань, хоча мали місце і сімейні спалахи. Найбільша кількість хворих виявлена в Одеській та Херсонській областях. Захворюваність на ГЗН у ПЗП характеризувалася вираженою сезонністю: випадки захворювання починали реєструватися в липні, а їх кількість досягала максимуму в вересні. Починаючи з листопада, захворювання не виявлялись.

При аналізі результатів серологічних досліджень методами ІФА і РГГА, було встановлено збіг позитивних результатів в (32,52±2,32) % випадків

при виявленні антитіл до вірусу ГЗН і в (12,76±2,38) % – до вірусу КЕ. При цьому у багатьох сироватках крові мешканців ПЗП одночасно були присутні антитіла до обох збудників – вірусів ВКЕ і ГЗН, які належать до однієї родини *Flaviviridae*. Паралельне дослідження 213 сироваток крові людей двома серологічними методами з антигенами двох флавівірусів виявило 9 варіантів поєднання 4-х серологічних маркерів. Відмічено переважання серед позитивних проб антигемаглютининів:

(94,94±1,74) % позитивних сироваток вміщували антигемаглютинини до вірусу ГЗН і (75,32±3,43) % – до вірусу ВКЕ. Імуноглобуліни класу G до вірусу ГЗН виявлено в (21,52±3,27) %, а до вірусу ВКЕ – в (17,09±2,99) % позитивних проб. Одночасна присутність антитіл до обох флавівірусів у (77,22±3,34) % позитивних взірців може свідчити як про мікст-інфікування, так і про відомий серед флавівірусів феномен перехресної реактивності (мал. 2).



Мал. 2. Співвідношення різних видів антитіл до флавівірусів кліщового енцефаліту і гарячки Західного Нілу в сироватках крові людей (за результатами ІФА і РГГА).

Дослідження біотичних об'єктів дозволили виявити циркуляцію в ПЗП арбовірусів, які передаються кліщами – віруси ВКЕ, ККГГ, Укуніємі, та комарами – віруси ГЗН, Сіндбіс, Тягіня, Інко, зайця-біляка. Виявлення вірусів ВКЕ, Укуніємі, ГЗН та Сіндбіс як у переносниках, так і тваринах-резервуарах свідчило про високу активність природних осередків цих арбовірусів.

У результаті вірусологічних досліджень потенційних переносників і носіїв арбовірусів було ізольовано 4 нейротропних вірусних агенти, які викликали у мишей летальний енцефаліт. Три з них виділені із кліщів *Ixodes ricinus*, один – із комарів *Aedes caspius caspius*. Ідентифікація виділених штамів не дозволила віднести їх до флавівірусів (у тому числі вірусів ВКЕ і ГЗН), вірусів ККГГ, Укуніємі, Сіндбіс, зайця-біляка, Тягіня і Батаї, що свідчить про циркуляцію в ПЗП інших видів, можливо досі невідомих, арбовірусів.

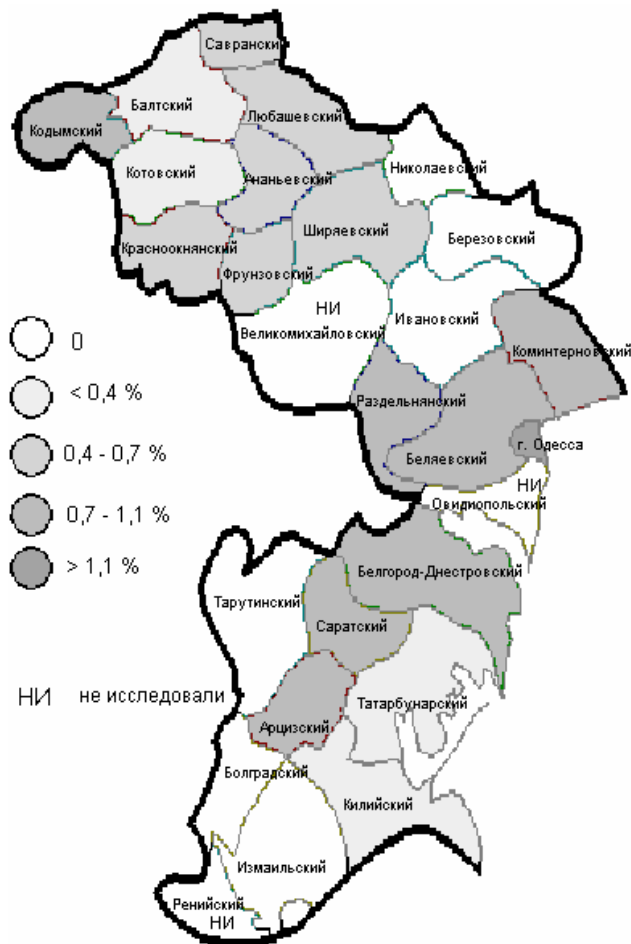
Аналіз просторових характеристик природних осередків ВКЕ, з урахуванням адміністративно-територіального розподілу, дозволив визначити

ендемичними з ВКЕ дві третини території Одеської області. Активна циркуляція вірусу ВКЕ, за даними оцінки показників вірусифорності кліщів, встановлена в центральній та північній частинах області (мал. 3).

Про значне розповсюдження в ПЗП вірусів ГЗН, Сіндбіс та Укуніємі свідчило виявлення вірусифорних переносників у різних, достатньо віддалених одна від одної, ландшафтних зонах: поймено-болотній і степовій – у центрі та на півдні Одеської області та лісостеповій – на півночі.

Аналіз видового складу кліщів показав, що переважна більшість вірусифорних вірусом ВКЕ кліщів належала до виду *Ixodes ricinus* – основного переносника європейського генотипу вірусу. У поодиноких випадках антиген ВКЕ було знайдено в кліщах *Dermacentor marginatus* и *Hyalomma marginatum marginatum*. Кліщі *I. ricinus* також були основними переносниками вірусу Укуніємі та єдиним видом, у якого було виявлено антиген вірусу ККГГ.

ПЕРЕДОВА СТАТТЯ



Мал. 3. Ендемічні території Одеської області щодо вірусу кліщового енцефаліту, за даними оцінки показників вірусифорності кліщів за визначенням антигену вірусу в ІФА.

Аналіз видового складу комарів, у яких було знайдено віруси ГЗН і Сіндбіс, показав провідну роль орнітофільного виду *Culex pipiens* у підтримці їх циркуляції в регіоні. На загал, вірус ГЗН знайдено у комарів 5-ти видів 4-х родів (*Aedes caspius dorsalis*, *A. duplex* Mart, *Anopheles bifurcatus*; *C. pipiens* і *Culiseta annulata*), а вірус Сіндбіс – у комарів 6-ти видів 4-х родів (*A. caspius dorsalis*, *A. duplex* Mart, *A. vexans*, *A. bifurcatus*, *A. hyrcanus* і *C. pipiens*).

Аналіз видового складу птахів, інфікованих вірусом ГЗН, показав, що підтримання вірусу в природних осередках ПЗП здійснюється, в основному, серед птахів 2-х екологічних груп. У циркуляції вірусу ГЗН беруть участь 8 видів водно-болотних (набережник *Actitis hypoleucos*, побережник чорногрудий *Calidris alpina*, пісочник великий *Charadrius hiaticula*, мартин жовтоногий *Larus*

cachinnans, мартин звичайний *Larus ridibundus*, бранець малий *Limnocyptes minimus*, брижач *Philomachus pugnax*, коловодник болотяний *Tringa glareola*) і 2 види синантропних птахів (ворона сіра *Corvus cornix* і голуб сизий *Columba livia*). Крім того, вірус ГЗН було знайдено в одного чагарниково-лісного виду (вільшанка *Erithacus rubecula*). Отримані дані свідчили про активну циркуляцію вірусу ГЗН серед водно-болотних і, що особливо важливо для розвитку епідемічного процесу, синантропних видів птахів.

Аналіз видового складу птахів, інфікованих іншими арбовірусами, показав участь представників чагарниково-лісної екологічної групи в циркуляції вірусів ВКЕ (вільшанка, *Erithacus rubecula*) і Укуніємі (волове очко *Troglodytes troglodytes* і чорний дрізд *Turdus merula*), водно-болотних видів – у підтриманні природних осередків вірусів Сіндбіс (побережник червоногрудий *Calidris ferruginea*) і Тягіня (брижач *Philomachus pugnax*), синантропних птахів – у циркуляції вірусу Інко (грак *Corvus frugilegus*). Вірус зайця-біляка виявлено у зайців-русаків (*Lepus europaeus*).

Важливим етапом наших досліджень було вивчення генетичних властивостей штамів вірусу ВКЕ, ізольованих від іксодових кліщів, зібраних в АР Крим, Одеській і Херсонській областях в 1988-1990 роках.

Аналіз нуклеотидних послідовностей гену білка оболонки Е виявив його 100 % ідентичність у всіх досліджених штамів. Порівняльне вирівнювання отриманих нами нуклеотидних послідовностей із послідовностями раніше вивчених штамів вірусу ВКЕ показало більш високий рівень ідентичності виділених у ПЗП штамів до штамів європейського генотипу – від 93,20 % (штам 12-8) до 97,18 % (штам Pan), при варіюванні збігу нуклеотидних послідовностей із сибірським і далекосхідним генотипами від 75,45 % (штам Usen-1) до 84,83 % (штам Vologda-2).

Приналежність штамів 80, 85, Саврань 160, 150, 120, 70 і 290 до європейського генотипу була також підтверджена даними філогенетичного аналізу та наявністю сигнатурних амінокислот 47(A), 88(G), 115(A), 178(E), 206(V), 267(A), 277(E), 317(A), 426(A), 431(S), 433(I) и 437(V), властивих для штамів європейського генотипу ВКЕ [10].

Вирівнювання і аналіз амінокислотних послідовностей білка оболонки Е дозволили виявити чотири амінокислотних заміщення в домейнах II і III ектодомену і трансмембранному сегменті: унікальне для штамів 80, 85, Саврань 160, 150,

120, 70 і 290 амінокислотне заміщення – аспаргін (N) – у позиції 67, та три амінокислотних заміщення, що рідко зустрічаються у штамів європейського генотипу: аргінін (R) – у позиціях 266 і 407 та валін (V) – у позиції 306.

Отже, результати комплексного вивчення в регіоні ПЗП свідчать про наявність багатокомпонентного природного осередку з мозаїчною структурою, де циркулює низка актуальних для людини арбовірусів. Встановлено високий ступінь активності природних осередків вірусів ГЗН, ВКЕ, Укуніємі та Сіндбіс, а також помірну циркуляцію в регіоні вірусів ККГГ, Тягіня й Інко. За медико-соціальним значенням найактуальнішими є два арбовірусних захворювання: ГЗН і ВКЕ. Високі показники сероепідеміологічного моніторингу порівняно з даними госпітального нагляду за хворими на гострі сезонні гарячкові стани нез'ясованої етіології дозволяють припустити, що більша частка хворих не виявляється у гострому періоді хвороби. Можливо, це пов'язано з легким клінічним перебігом арбовірусних захворювань, не слід виключати і неспроможність лабораторної мережі до верифікації діагнозу навіть при тяжких клінічних формах хвороби.

Важливим результатом роботи було визначення видового складу резервуарів і переносників арбовірусів. Показано, що найбільш епідемічно значущими видами кровосисних членистоногих є іксодовий кліщ *I. ricinus* – основний вектор вірусу ВКЕ, і комар *C. pipiens* – основний вектор вірусу ГЗН.

Визначення генетичних особливостей штамів ВКЕ, виділених на території ПЗП, вперше дозволило довести циркуляцію у природних осередках регіону європейського (західного) генотипу ВКЕ, специфічними маркерами популяції якого є чотири амінокислотних заміщення. Це вкрай важливо для клінічної діагностики ВКЕ, адже маніфестація хвороби при ураженні європейським (західним) генотипом ВКЕ суттєво відрізняється від такої при ураженні людини далекосхідним генотипом ВКЕ.

Література

1. Global trends in emerging infectious diseases / [K.E. Jones, N.G. Patel, M.A. Levy et al.] // Nature. – 2008. – N 451. – P. 990-994.
2. Morse S.S. Factors and determinants of disease emergence / S.S. Morse // Rev. Sci. Tech. – 2004. – N 23. – 443-451.
3. Semenza J.C. Climate Change and Infectious Diseases in Europe / J.C. Semenza, B. Menne // Lancet ID. – 2009. – N 9. – P. 365-375.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Emergency preparedness and response. Bioterrorism [cited 2009 Mar 31]. Available from <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>;

5. Broussard L.A. Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism / Broussard L.A. // Mol. Diagn. – 2001. – Vol. 6, N 4. – P. 323-333.

6. Donoso Mantke O. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries / O. Donoso Mantke, R. Schadler, M. Niedrig // Euro Surveill. – 2008. – Vol. 13, N 17. – pii=18848. – Режим доступу: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18848>

7. Итоги 20-летнего изучения иксодовых клещей из территории Крыма в отделе ООИ Крымской республиканской СЭС / [И.Л. Евстафьев, Н.Н. Товлинец, Б.Н. Леженцев и др.] // Матер. науч.-практ. конф. з питань ОНІ, біологічної безпеки та протидії біологічному тероризму. – Іллічівськ, 2005. – С. 183-184.

8. Серебряков В.В. Екологічні закономірності міграції птахів фауни України в часі та просторі: автореф. дис. ... д-ра біол. наук / В.В. Серебряков. – К., 2002. – 21 с.

9. Фесенко Г.В. Птахи фауни України: польовий визначник / Г.В. Фесенко, А.А. Бокотей; ілюстрації І.І. Землянських, С.Ю. Костіна, Ю.В. Костіна – К., 2002. – 416 с.

10. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz // J.Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P. 179-185.

ARBOVIRAL INFECTIONS IN THE NORTHWEST BLACK SEA COAST

N.A. Vynohrad, O.A. Yurchenko, D.A. Dubina

SUMMARY. *The study of arboviral infections in natural foci and among humans in the Northwest Black Sea Coast was done. Species composition of arthropods and birds that provide circulation of tick-borne encephalitis, West Nile, Sindbis, Ukuniemi viruses in natural foci is defined; epidemic potential of the biotic objects in terms of vectors' infection rate and virus antigen/RNA detection in samples from vertebrates is evaluated. Seroprevalence rates of different population groups as objective laboratory indicators of circulation of arboviruses among the human population of region are determined. Infection cases caused by tick-borne encephalitis and West Nile viruses among seasonal patients with unknown etiology fever is defined. Circulation of European (Western) tick-borne encephalitis virus genotype in the Northwest Black Sea Coast is proved, analysis of amino acid sequences revealed the presence of four marker amino acid replacements – 67(N), 266(R), 306(V) and 407(R), in the domains II and III of ectodomain and transmembrane segment of E protein.*

Key words: *arboviral infections, Northwest Black Sea Coast, immunity.*

Отримано 27.08.2013 р.