

УДК: 57.083.2:578.833Togaviridae(571.6)

МОНИТОРИНГ АРБОВИРУСОВ НА ТЕРРИТОРИИ ДАЛЬНОГО ВОСТОКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**С.В. Бахметьева, Н.И. Здановская, Н.П. Высочина, Н.Б. Белозерова,
О.М. Уткина, А.Г. Ковальский**

*ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора,
г. Хабаровск, Российская Федерация*

Представлены результаты мониторинговых исследований на территории Дальневосточного Региона РФ в отношении ряда природно-очаговых вирусов, в том числе Западного Нила, Батаи, Комплекса калифорнийской серогруппы, а также завозных случаев арбовирусных заболеваний. Полученные данные указывают на активную циркуляцию арбовирусов в природных очагах и синантропных биоценозах на территории некоторых субъектов Дальнего Востока РФ и вероятность заноса возбудителей посредством транспортных и туристических связей.

Ключевые слова: арбовирусы, природно-очаговые инфекции, специфическая диагностика, антитела, завозные случаи

MONITORING ARBOVIRUSES IN THE TERRITORY FAR EASTERN RUSSIA

**S.V. Bakhmetyeva, N.I. Zdanovskaya, N.P. Vysochina, N.B. Belozerova, O.M. Utkina,
A.G. Kovalskij**

Khabarovsk Antiplague Research Institute of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rosпотребнадзор), Khabarovsk, Russian Federation

The results of monitoring studies in the territory of some regions of the Far East in respect of a number of natural focal viruses, including West Nile virus, encephalitis Batai, California serogroup and imported cases of arbovirus diseases for the 2011 – 2017. The data obtained indicate active circulation of arboviruses in natural foci and synanthropic biocenoses on the territory of some subjects of the Far East Russia and probability of drift of causative agents through transport and tourist connections.

Key words: arboviruses, natural focal infections, specific diagnostics, antibodies, imported cases

Арбовирусные инфекции – это инфекции с природной очаговостью, которые в естественных условиях передаются, главным образом, через укус кровососущих членистоногих. Большинство арбовирусных инфекций являются зоонозами. Циркуляция возбудителей осуществляется среди диких и сельскохозяйственных животных, а также среди птиц, зимующих в странах субтропического-тропического и субэкваториально-экваториального климата. Пути миграции перелетных птиц, проходящие на территории Дальнего Востока РФ, определяют возможность заноса арбовирусов с мест зимовок с дальнейшим формированием сезонных или стойких природных очагов [3, 4, 9].

Переносимые комарами вирусы, бактерии и простейшие, вызывают эпидемии и эпизоотии с большими экономическими потерями [4]. По оценкам ВОЗ экспансия флавивирусов Западного Нила и Денге в эндемичные районы, вспышки, вызванные вирусом Чикунгунья, наряду с туляремией и малярией приводят к 1 млрд клинически подтвержденных заболеваний и 1 млн смертельных случаев ежегодно.

Актуальность изучения эпидемиологии арбовирусных инфекций обусловлена их повсеместной распространенностью, массовостью эпидемических вспышек, трудностью этиологической расшифровки из-за большого антигенного разнообразия возбудителей, недостаточностью специфических средств лечения и профилактики. Ежегодный мониторинг за циркуляцией арбовирусов обусловлен наличием в России природных очагов вирусных энцефалитов [1, 4, 5, 7]. Кроме того, в последнее время в связи с развитием массового туризма, интенсификацией миграционных процессов, деловых и торговых связей возникла проблема завозных зоонозных вирусных инфекций из тропических и субтропических стран мира в эндемичные регионы [2, 6, 12].

Целью наших исследований явилось изучение циркуляции природно-очаговых и завозных случаев арбовирусных инфекций на территории Дальнего Востока.

Материалы и методы

Мониторинг за природными очагами включал обследование на маркеры арбовирусов потенциальных переносчиков, источников инфекции, ретроспективное исследование крови больных с неуточненным диагнозом, поступивших в инфекционные стационары в период наибольшей активности переносчиков - с июля по сентябрь. На инфицированность вирусами Западного Нила (ЗН), Калифорнийской серогруппы (КСГ), энцефалита Батаи и других арбовирусов обследовались дикие перелетные и синантропные птицы, комары, крупный рогатый скот, лошади. Сбор проб проводился выездными формированиями станции и охотоведческими структурами в различные временные периоды. Диапазон лабораторных исследований включал серологические, вирусологические и генодиагностические тесты.

Детекцию РНК ЗН и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) проводили методом ОТ-ПЦР с использованием тест-систем «АмплиСенс TBE-FL» и «АмплиСенс WNV-FL» производства ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва). Для детекции РНК флавивирусов использовали ОТ-ПЦР с праймерами, соответствующими фрагменту гена NS5 флавивирусов [13]. Специфичность продуктов ОТ-ПЦР подтверждали определением нуклеотидных последовательностей с использованием автоматического анализатора ДНК модели ABI 3500 («Applied Biosystems») и последующего филогенетического анализа. Для изоляции штаммов использовали перmissive культуру клеток Vero-E6 и заражение новорожденных белых мышей (НБМ). Лабораторному тестированию подвергнуты 398 птиц, 62750 экзemplаров (251 пул по 250 экз.) комаров, 344 лошади и 497 голов крупного рогатого скота (КРС).

В течение 7 лет нами осуществлялся этиологический мониторинг завозных случаев арбовирусных заболеваний. Обследованы 286 больных, посетивших страны Юго-Восточной Азии. Подавляющее большинство из них отдыхали в Таиланде. Основными симптомами заболевания являлись лихорадка, сыпь, суставные боли. Для постановки лабораторного диагноза на первой неделе от начала заболевания с 2011 года применяли ПЦР тестирование с применением наборов праймеров, специфичных к вирусам Денге 1 – 4 серотипов [8], а впоследствии использовали набор реагентов «АмплиСенс» на присутствие РНК вирусов Денге (1-4) и иммунохроматографический тест («Dengue NS1 Ag», Standard Diagnostics) на наличие NS1 антигена вируса Денге. Серологический статус больных определялся с помощью ИФА-тест-систем на выявление IgM и IgG к вирусам Западного Нила, Денге, Чикунгунья, Крымская-Конго геморрагическая лихорадка. При наличии IgG к вирусу Денге в целях исключения перекрестных реакций иммунитета с другими представителями флавивирусов осуществлялась постановка РН с вирусами Западного Нила (шт. FCG) и клещевого энцефалита (шт. Софьин). При отрицательных результатах на природно-очаговые заболевания и геморрагические лихорадки и наличии парных проб крови осуществляли постановку РТГА с диагностикумами вирусов гриппа и парогриппа.

Возможное участие в инфекционной патологии вирусов лихорадки Западного Нила, Батаи и ККЭ изучалось ретроспективным обследованием доноров и больных людей, госпитализированных в инфекционные стационары в период максимальной активности комаров. Сыворотки 179 здоровых людей и 234 пациентов с лабораторно не расшифрованными диагнозами (ЛНГ, энцефалит, менингит, ОРВИ, клещевые инфекции) были тестированы в реакции нейтрализации (РН) с вирусами ЗН (шт. FCG), Батаи (шт. 9024) и КСГ (шт. Заяц-Беляк).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены данные мониторинговых исследований по изучению иммунной прослойки у перелетных птиц и сельскохозяйственных животных за 2011 – 2017 гг. на территории Хабаровского края и Еврейской автономной области в отношении ряда природно-очаговых инфекций, в том числе: Западного Нила, энцефалита Батаи, вирусов КСГ.

Таблица 1.

Результаты исследований по идентификации антител в реакции нейтрализации к арбовирусам в сыворотках крови птиц и сельскохозяйственных животных

Показатели/ год	ВЗН		КСГ		Вирус Батаи	
	Птицы, экз.	СХЖ, голов	Птицы, экз.	СХЖ, голов/ +	Птицы, экз.	СХЖ, голов/+
2011	120	100	120	100 /13	120	100/23
2012	30	170	30	170/7	30	170/49
2013	37	153	37	153/37	37	100/15
2014	39	101	39	101/8	39	113/4
2015	9	98	9	98/12	9	98/ 9
2016	0	119	0	119/26	0	119/4
2017	0	100	0	100/27	0	100/4
Всего	235	841	235	841	235	841
Колич-во полож.	3	0	2	133	3	140
% положит	1,3	0	0,8	15,8	1,3	16,6

У диких водоплавающих птиц (чайки, утки) показатель серопозитивности к ВЗН составил 1,3%, к вирусам КСГ – 0,8%, к вирусу Батаи – 1,3%. Анализ изучения иммуноструктуры сельскохозяйственных животных – прокормителей членистоногих показал наличие специфических антител как к вирусам КСГ (15,8%), так и к вирусу Батаи (16,6%). При более детальном анализе можно отметить существенные различия в чувствительности к этим двум возбудителям у различных видов сельскохозяйственных животных. У лошадей уровень серопозитивности к вирусам группы ККЭ составила 27,3%, а у КРС – 7,8%; к вирусу Батаи наоборот – частота обнаружения специфических антител выше у КРС – 20,3%, чем у лошадей – 2,0%. Уровни антител определялись в диапазоне от 1:10 до 1:160. Результаты наших исследований согласуются с данными ряда авторов о высокой чувствительности лошадей к вирусам КСГ [10]. В 2013 году в пробах крови 2 больных и 8 здоровых людей обнаружены специфические нейтрализующие антитела к вирусам КСГ. Нейтрализующие антитела к возбудителю ЛЗН обнаружены у трех водоплавающих птиц в 2012 и 2015 гг. в титрах 1 : 20 – 1 : 80. В результате молекулярно-генетического мониторинга за циркуляцией вируса Западного Нила среди перелетных птиц в 6 из 397 проб головного мозга детектирована РНК вируса Западного Нила. Показатель инфицированности составил 1,5%. Кроме того, в пробах крови 2-х больных и 8 здоровых людей ретроспективно были выявлены специфические антитела к вирусу КСГ.

Исследованиями по изучению циркуляции арбовирусов в популяциях кровососущих членистоногих за семилетний период были охвачены Хабаровский край, Сахалинская и Еврейская автономная области. Видовой состав не определялся (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследований комаров, отловленных на территории Хабаровского края, Сахалинской, Амурской и Еврейской автономной областей

Год	Кол-во экз./пул.	ПЦР (Flavi, TBE, WNV)	Серологич. исследования всего / +	Вирусологич. исследования, всего/ +	Биологические исследования, всего/ +	Выделенные ПА
2011	5500/ 22	22/ 0	0	44/ 0	22/ 0	0
2012	7000/ 28	28/ 0	56/ 0	56/ 2	28/ 5	7 НПА
2013	13250/53	53/4 (Flavi)	106/ 0	106/ 0	53/ 2	2 Chaoyang
2014	9500/ 38	38/ 0	76/ 2 ККЭ	76/ 3	38/ 0	1 ВКЭ, 2 Гета
2015	7500/ 30	30/ 0	150/ 0	60/ 0	30/ 2	2 НПА
2016	10000/ 40	40/1 (TBE)	120/ 0	80	40/0	0
2017	10000/ 40	40/ 0	120/ 0	80/3	40/6	9 (КСГ)
Всего	62750/251	251 / 5	628 / 2	502 / 8	251/ 15	23

Примечание: ПА – патогенные агенты, НПА – не идентифицированные патогенные агенты

Антиген вирусом КСГ выявлен методом ИФА (тест-системы ЗАО «Биосервис») в двух пулах комаров, отловленных в южных районах Хабаровского края. В 2013 году из 28 пулов комаров, добытых в Смидовичском районе ЕАО, в 4 пробах обнаружен генетический материал флавивирусов (не идентифицированных), а в 2016 г. – РНК вируса клещевого энцефалита. Детекция РНК вируса Западного Нила не дала положительных результатов.

На перевиваемых клеточных линиях и мышцах сосунках из 10%-ных суспензий комаров удалось получить 23 изолята. Один из них типирован как ВКЭ, два других, по результатам РН с ИАЖ к различным арбовирусам, были определены как вирусы Гета (сем. Togaviridae), остальные 9 – как вирусы КСГ.

В 2013 из ПЦР позитивных проб на наличие РНК флавивирусов удалось выделить 2 биологических агента, патогенных для новорожденных белых мышей. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS5 определил их как флавивирус Chaoyang, ранее выявленный в Китае и Корее [11]. При последующих пассажах штаммы теряли свою патогенность. Из числа штаммов, полученных в течение семилетнего периода наблюдения, не удалось идентифицировать 9 изолятов.

Возрастающая торгово-экономическая и туристическая активность ДФО с зарубежными странами обозначила актуальность проблемы завозных арбовирусных заболеваний. В анализируемом периоде обследовано 286 пациентов – жителей Хабаровского и Приморского краев, а также Сахалинской, Амурской, Магаданской областей и Еврейской АО. Для подавляющего большинства обследованных лиц страной посещения были Таиланд или Вьетнам (табл. 3). Диагноз «Лихорадка Денге» подтвержден у 136 заболевших, в т.ч. выделением вирусов Денге 1-3 серотипов на клеточной культуре Vero E6 и мышцах сосунках у 20 обследованных (Хабаровский край, Амурская область, Приморский край).

Таблица 3

Результаты мониторинга завозных случаев инфекционных болезней из стран и регионов, эндемичных по вирусным лихорадкам и энцефалитам

Количество обследованных	Хабаровский край	Приморский край	Амурская область	ЕАО	Другие регионы	Всего
Всего	212	54	13	3	4	286
Положительных, в т.ч.	96	43	7	0	3	149
лихорадка Денге	90	37	7	0	2	136
лихорадка Западного Нила	0	2	0	0	0	2
лихорадка Чикунгунья	0	1	0	0	0	1
флавивирусная инфекция	2	2	0	0	0	4
малярия	2	0	0	0	0	2
грипп А	2	1	0	0	1	4

В декабре 2015 года впервые на Дальнем Востоке зарегистрирован летальный случай лихорадки Денге, связанный с поездкой в Таиланд. У больного, жителя г. Комсомольска-на-Амуре Хабаровского края, наблюдалась тяжелая форма лихорадки Денге с синдромом шока. Этиологический диагноз был установлен на основе наличия IgM в титре 1:3200, антигена NS1 в пробах крови, сыворотки, суспензии селезенки, детекции РНК вируса Денге 2 генотипа в крови.

У двух жителей Приморского края серологическими методами выявлена ЛЗН, а еще один пациент оказался инфицирован вирусом лихорадки Чикунгунья (ЛЧ). Диагноз «Флавивирусная инфекция» был подтвержден у 2-х хабаровчан и 2-х жителей Приморского края. Во всех лабораторно подтвержденных случаях ЛД, ЛЗН и ЛЧ этиологический диагноз был установлен по наличию 2-3 положительных тестов. На протяжении периода наблюдения были подтверждены 2 случая малярии у жителей г. Хабаровска: один в течение трех месяцев находился в рабочей командировке в Южной Америке, второй – посетил остров Гоа (Индия). Основанием для постановки этиологического диагноза явилось наличие в крови пациентов антигена и специфических антител к *Pl. falciparum* и *Pl. ovalae*. С сентября 2016 года в связи со вспышкой заболеваемости лихорадкой Зика в странах Южной Америки и Карибского бассейна нами параллельно проводились ПЦР исследования на наличие РНК вируса Зика. Положительных находок не обнаружено. У 4 пациентов альтернативным диагнозом, подтвержденным положительной сероконверсией, оказался грипп А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm. Еще у одного больного был документирован четырехкратный прирост антител к вирусу парагриппа 3 типа.

Заключение

Таким образом, данные экологического мониторинга за арбовирусными заболеваниями дают основание полагать, что на территории Дальнего Востока функционируют природные очаги клещевого энцефалита, энцефалита Батаи, вирусов Гета и Калифорнийской серогруппы, передаваемые кровососущими членистоногими. Подтверждена существенная роль в циркуляции арбовирусов лошадей, крупного рогатого скота, перелетных и синантропных птиц. Необходимость проведения мониторинга за арбовирусами определяется реальной опасностью заносов возбудителя этого заболевания перелетными птицами и формирования очагов инфекции на территории ДФО Российской Федерации. Высока также вероятность заноса возбудителей посредством транспортных и туристических связей. Необходимо дальнейшее наблюдение за распространением арбовирусных инфекций на территории Дальневосточного округа, а также усиление эпидемиологической настороженности практических врачей ЛПУ и их нацеленность на более широкое, с учетом эпиданамнеза, лабораторное обследование лихорадящих больных на маркеры арбовирусных инфекций. Дальнейшие исследования по идентификации и выявлению новых штаммов арбовирусов позволят дать более полную характеристику природных очагов в Дальневосточном Регионе РФ.

Литература.

1. Колобухина Л.В., Львов С.Д. Калифорнийский энцефалит. В кн.: Медицинская вирусология: Руководство / Под ред. Д.К. Львова. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. – С. 534 – 542.

2. Ларичев В.Ф., Сайфулин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В. и др. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. - №1. – С. 35 – 38.
3. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. – М.: Наука, 1978. – 271 с.
4. Львов Д.К., Клименко С.И., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. – М.: Медицина, 1989. – 335 с.
5. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б. и др. Особенности циркуляции вирусов Западного Нила и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000 – 2001 гг.) // Вопр. Вирусол. – 2004. - №3. – С. 45 – 51.
6. Попов А.Ф., Симакова А.И., Киряков В.Ю., Сокотун С.А. и др. Завозные арбовирусные инфекции в Приморском крае // Инфекционные болезни. – 2014. – 12. – 250 с.
7. Щелканов М.Ю., Бурухина Е.Г., Жебровская Е.В., Петрова Н.К. Мониторинг арбовирусов на территории Приморского края // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – 3 (66). – С. 157 – 161.
8. Harris E., Roberts G., Smith L., Selle J. et al. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR / Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – Vol. 36. – No. 9. – P. 2634 – 2639.
9. Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S. et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 7. – P. 675 – 678.
10. Le Duc J.W. Epidemiology and ecology of the California serogroup viruses // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1987. – Vol. 37 – P. 60 – 68.
11. Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Bakhmetyeva S.V. et al. Detection of the Insect-Specific Flavivirus Chaoyang in Mosquitoes in the Jewish Autonomos Region of the Far East of Russia // Journal of Neuroinfectious Diseases. – №1. – 2016. – V. 7.
12. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Bakhmetyeva S.V., Zdanovskaya N.I. et al. Molekular Typing of imported Dengue Virus (DENV) isolates from Patients in the Far East of Russia // J. virol. Emerg. Dis. – 2015. – V.1. – P. 1 – 5.
13. Scaramozzino N., Crance J., Jouan A. et al. Comparision of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – Vol. 39. – No. 5. – P. 1922 – 1927.

Сведения об авторах:

Ответственный автор: *Бахметьева Светлана Васильевна* – врио зав. лабораторией ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора, тел. (4212)33-46-25, e-mail: chum@chum.khv.ru