

УДК: 616.928.8-02(571.6)

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РАСШИФРОВКА ЗАВОЗНЫХ СЛУЧАЕВ ТРОПИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ

С.В. Бахметьева¹, Н.М. Пуховская¹, Н.И. Здановская¹, Л.И. Иванов¹,
Н.Б. Белозерова¹, О.М. Уткина¹, Я.А. Журавлев², В.Ф. Ларичев³

¹ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора, Хабаровск

²КГБУЗ «Городская клиническая больница №10 Минздрава Хабаровского края, Хабаровск

³ФГУ «Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Иванова» Минздравсоцразвития, Москва

Представлены результаты расшифровки завозных случаев арбовирусных лихорадок в Дальневосточном регионе России за период 2011-2014 гг. Диагноз лихорадка Денге подтвержден у 56 больных и выявлены по одному больному лихорадками Западного Нила и Чикунгунья. При подтверждении клинического диагноза использовали ИФА для выявления IgM/IgG антител и ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал наличие вирусов Денге 1, 2 и 3 типа. Используя культуру клеток Vero E6 и новорожденных белых мышей, изолированы пять штаммов вируса Денге 1 и 3 типа.

Ключевые слова: арбовирусные инфекции, лихорадка Денге, завозные случаи

ETIOLOGICAL DECODING OF IMPORTED CASES OF TROPICAL FEVERS IN THE FAR EASTERN REGION

S.V. Bakhmeteva¹, N.M. Pukhovskaya¹, N.I. Zdanovskaya¹, L.I. Ivanov¹, N.B. Belozerova¹,
O.M. Utkina¹, Ya.A. Zhuravlev², V.F. Larichev³

¹Khabarovsk Antiplague Station of Rospotrebnadzor, Khabarovsk

²Municipal Clinical Hospital N 10 of Public Health Ministry of Khabarovsk Territory, Khabarovsk

³Research Institute of Virology by D.I. Ivanovsky of Public Health Ministry of Social Development, Moscow

Decoding data of imported arbovirus fever cases in the Far Eastern region of Russia in 2011-2014 are represented. Dengue fever diagnosis was confirmed in 56 patients; one patient with West Nile fever and one patient with Chikungunya fever were revealed. If the clinical diagnosis was confirmed, IFA was used to reveal IgM/IgG antibodies and RT-PCR. RT-PCR and the phylogenetic analysis of nucleotide sequences showed the presence of Dengue type 1, 2 and 3 viruses. Five Dengue type 1 and 3 virus strains were isolated using Vero E6 cell culture and newborn white mice.

Key words: Arbovirus infections, a Dengue fever, imported cases.

Глобальное распространение лихорадок Западного Нила (ЛЗН), Денге (ЛД), Чикунгунья (ЛЧ) и других тропических инфекций, передающихся трансмиссивным путем, массовость эпидемических вспышек, одновременная циркуляция различных возбудителей на отдельно взятой территории обуславливают высокий риск заражения для «визитеров» из эндемичных регионов [1, 2, 3]. Ежегодный рост туризма, в том числе экологического, территориальная близость со странами Юго-Восточной Азии – излюбленным местом отдыха дальневосточников, способствуют увеличению количества случаев инфицирования туристов вирусами Денге (ВД), Западного Нила (ВЗН), Чикунгунья (ВЧ) и другими патогенами, эндемичными для данных стран.

Цель работы – комплексное лабораторное обследование больных, вернувшихся из туристических поездок, для выявления завозных случаев арбовирусных инфекций.

Материалы и методы

Иммунологические тесты включали определение IgM и IgG к возбудителям ЛД, ЛЗН, ЛЧ, Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) и клещевого энцефалита (КЭ). Использовали наборы реагентов ЗАО «Биосервис», ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), «Евроиммун» (Германия). Диффе-

рнциальную диагностику проводили, сравнивая титры IgM антител к ВЗН и ВД, а также при обнаружении IgG по наличию нейтрализующих антител к эталонным штаммам вируса КЭ (штамм Софьин) и вируса ЗН (штамм FCG). Образцы, взятые на 2-7 день болезни, тестировали иммунохроматографическим методом («Евроиммун», Германия) на наличие белка NS1 вируса Денге, а также антигенов малярийных плазмодиев.

ПЦР-исследования включали детекцию РНК с помощью тест-систем «АмплиСенс WNV-FL» и «АмплиСенс *Dengue viru stype* – FL» (Интерлабсервис, Москва, Россия). Для типирования были использованы набор праймеров, специфичных к вирусам Денге 1-4 серотипов, и двухраундовая ПЦР с универсальными праймерами к флавивирусам [4, 5]. Специфичность продуктов ОТ-ПЦР подтверждали определением нуклеотидных последовательностей с использованием BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit и автоматического анализатора ДНК модели ABI 3500 (Applied Biosystems, США) с последующим филогенетическим анализом.

Выделение вирусов Денге проводили на 2-3-дневных сосунках лабораторных белых мышей (НБМ) путем комбинированного (в/м, п/к) заражения и последующих пассажей. Кроме того, осуществлялся посев лейкоцитарной взвеси и суспензий сгустков крови больных людей на монослой перевиваемой клеточной культуры (КК) Vero-E6.

Результаты и обсуждение

За период с мая 2011 г. по май 2014 г. из лечебных учреждений региона поступило 180 проб крови от 131-го больного с предварительными диагнозами лихорадка неясного генеза (ЛНГ) или ЛД, прибывших незадолго до заболевания из стран Юго-Восточной Азии, Африки и Китая. Основные симптомы заболевания в период начальных проявлений у всех больных носили общетоксический характер. Согласно данным лабораторного тестирования (таблица), у 56 пациентов диагностирована ЛД – 43,0 % от числа обследованных лиц. Кроме того, подтверждено по одному случаю ЛЗН и ЛЧ. Ретроспективный анализ 21 парной сыворотки, серонегативной относительно арбовирусов и малярии, выявил у трех больных четырехкратный прирост антител к вирусам гриппа А (2- Н3N2, 1 – Н1N1v). В 70 случаях (53,4 %) лабораторный диагноз установлен не был.

Таблица 1.

Результаты этиологической расшифровки лихорадок неясной этиологии среди лиц, прибывших из туристических поездок, за период 2011-2014 гг.

Лабораторный диагноз	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	Всего	
					человек	%
Всего обследовано	2	48	68	13	131	100
из них положительных на:						
Лихорадка Денге	1	23	27	5	56	43
Лихорадка Западного Нила	0	1	0	0	1	0,8
Лихорадка Чикунгунья	0	1	0	0	1 из 74	1,4
Грипп А	0	0	3	0	3 из 21	14,3
Не установлен диагноз	1	23	38	8	70	53,4

Этиологический диагноз у 52 больных, обследованных на 5-30-й дни после появления первых симптомов заболевания, установлен по наличию или положительной сероконверсии IgM антител к ВД, титры которых достигали 1:25600. У 24 из них определялись перекрестные IgM к вирусу ЗН, однако их уровень был в четыре и более раз ниже титра IgM антител к ВД. Присутствие IgG (от 1:200 до 1:50000) документировано в 35 случаях, преимущественно у привитых против КЭ, что свидетельствует о перекрестных иммунологических реакциях между представителями флавивирусов. Наряду с присутствием IgM, у 12 из 52 серопозитивных к ВД лиц иммунохроматографическим тестом обнаружен антиген NS1. Основанием для лабораторного подтверждения ЛД у четырех пациентов, обследованных однократно на 2-4 дни болезни, когда серологическая диагностика затруднена, считали наличие в крови антигена NS1 и РНК ВД.

Проведенный ПЦР анализ 163 образцов крови от 85 больных с подозрением на заболевание тропическими лихорадками показал наличие РНК флавивирусов у 17 из них. В одиннадцати случаях удалось протипировать вирус Денге: пять – Денге 1, три – Денге 2 и три – Денге 3. Все ПЦР-позитивные пробы были получены от больных, ранее посещавших Тайланд. Из крови пациентов выделены четыре штамма вируса Денге на КК Vero E6 и один штамм – при заражении мышей-сосунков.

Молекулярное типирование на основании двух локусов флавирусного генома – фрагментов генов C-preM и NS5 – показало принадлежность четырех штаммов вируса Денге к 1 типу и одного изолята к Денге 3 (GeneBank accession numbers KJ396963–KJ396967, KJ417841–KJ417844).

ЛЗН диагностирована по наличию IgM в титре 1:6400 и вируснейтрализующих антител в титре 1:10 у пациента, вернувшегося из Таиланда. Еще у одного больного, отдохавшего в Индонезии, на 8 день заболевания обнаружены IgM к ВЧ в титре 1:6400, что явилось основанием для постановки этиологического диагноза.

Таким образом, согласно данным комплексных лабораторных исследований, нами было подтверждено 56 завозных случаев лихорадки Денге из Таиланда, Вьетнама, Филиппин, в числе которых 18 жителей Приморского края, 36 – Хабаровского края, два – Сахалинской области, а также по одному случаю ЛЗН и ЛЧ у жителей Приморского края.

Заключение

Впервые на территории Дальневосточного региона зарегистрированы завозные случаи ЛД, ЛЗН и ЛЧ. В этой связи необходима координация взаимодействия между специалистами различного профиля для совершенствования системы раннего выявления, эпидемиологического расследования и дифференциальной лабораторной диагностики не только арбовирусных инфекций, но и заболеваний, обусловленных респираторными и другими патогенами. Чрезвычайно актуальным становится усиление эпидемиологической настороженности практических врачей ЛПУ и их нацеленность на более широкое, с учетом эпиданамнеза, лабораторное обследование лихорадящих больных на маркеры арбовирусных инфекций.

Литература

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева – М.: Медицина, 2009. – 472 с.
2. Львов Д.К. Новые и возвращающиеся вирусные инфекции – дремлющий вулкан // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2009. – №1. – С. 52-61.
3. Руководство по медицинской вирусологии / Под ред. Д.К. Львова. – М.: Медицина, 2008. – С. 493-494.
4. 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.
5. Scaramozzino N., Crance J., Jouan A. et al. Comparison 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.

Ответственный автор

*Бахметьева Светлана Васильевна – биолог вирусологической лаборатории ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора, канд. биол. наук
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru*