

та и имеет склонность к рецидивированию (у половины больных). Течение заболевания имеет особенности: выраженность клинических проявлений зависит от степени поражения иммунной системы, оценочным показателем которой является уровень снижения CD4-лимфоцитов. Множественные пузыри на фоне выраженной отечности наблюдаются у больных с количеством CD4-клеток ниже 450 в 1 мкл. Высокая склонность этих больных к гнойно-воспалительной патологии определяется почти пятикратным снижением показателя стимулированного НСТ-теста, что свидетельствует о глубоком угнетении завершающего фагоцитоза. Особенности сочетанного течения указанных выше инфекций требуют особой тактики ведения данной категории пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Бартлетт Д., Галлант Д.* «Клинические аспекты ВИЧ-инфекции, 2005—2006». — Издательская бизнес группа Дж. Хопкинса. Балтимор. Мэриленд. США, 2006. — 455 с.

2. *Белозеров Е. С.* Медленные инфекции / Е. С. Белозеров, Ю. И. Буланьков, Е. А. Иоаниди. — Э.: Изд-во Джангар, 2009. — 316 с.

3. *Гаранжа Т. А.* Актуальные проблемы герпесвирусных инфекций / Т. А. Гаранжа, Ф. П. Филатов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. — 82 с.

4. *Инфекционные болезни: национальное руководство* / Н. А. Малышев [и др.]; под ред. Н. Д. Ющука, Ю. Я. Венгерова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 752 с.

5. *Иоаниди Е. А., Чернявская О. А., Макарова И. В., Тимонова М. С.* // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2010. — № 1. — С. 70—74.

6. *Исаков В. А.* Современная терапия герпесвирусных инфекций. — СПб. — М., 2004. — 14 с.

## Контактная информация

**Макарова Инна Васильевна** — к. м. н., ассистент кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией и тропической медициной, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: mal55597@yandex.ru

УДК 578.52

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МОНИТОРИНГ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА<sup>1</sup>

**С. С. Савченко, В. А. Антонов, Г. А. Ткаченко, В. В. Алексеева, О. В. Зинченко,  
К. В. Жуков, И. М. Шпак, А. А. Батурич, В. П. Смелянский, Е. В. Путинцева**

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,  
Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра молекулярной биологии и генетики*

В данной статье представлены данные о молекулярном мониторинге вируса Западного Нила. Показана эффективность и актуальность внедрения новейших и разработки экспериментальных тест-систем для генной идентификации и внутривидового типирования возбудителя лихорадки Западного Нила.

*Ключевые слова:* лихорадка Западного Нила, тестовые системы, молекулярная диагностика.

## MOLECULAR MONITORING OF WEST NILE VIRUS

**S. S. Savchenko, V. A. Antonov, G. A. Tkachenko, V. V. Alekseeva, O. V. Zinchenko,  
K. V. Zhukov, I. M. Shpak, A. A. Baturin, V. P. Smelyanskiy, E. V. Putintseva**

The article presents molecular monitoring data of West Nile virus. This data shows the efficiency and relevance of the introduction of the latest test systems and development of experimental ones for gene identification and typing of the causative agent of WNV.

*Key words:* West Nile fever, test system, molecular diagnostics.

Одной из наиболее значимых арбовирусных инфекций на территории Российской Федерации является лихорадка Западного Нила, или вирусный Западно-Нильский энцефалит. Его возбудитель относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирус имеет сферическую форму, его размер 20—30 нм, содержит одонитевую несегментированную РНК, его репликация проис-

ходит в цитоплазме пораженных клеток. Вирус Западного Нила (ВЗН) принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита, включающего также возбудителей энцефалита Сент-Луис, желтой лихорадки, денге и др. (более 15 нозоформ). Впервые этот вирус был выделен в 1937 г. в Уганде при массовом обследовании на носительство вируса желтой лихорадки у боль-

<sup>1</sup>Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ и администрации Волгоградской области в рамках научно-исследовательского проекта «Социально-медицинские аспекты распространения вируса лихорадки Западного Нила в городской агломерации крупного промышленного центра Поволжья», № 11-16-34011 а/В.

ной с лихорадочным заболеванием, сопровождавшимся сонливостью. Через три месяца в крови у нее были обнаружены антитела против выделенного вируса ЛЗН [6].

Первые лабораторно подтвержденные случаи ЛЗН в России были выявлены в Астраханской области в 1967 г. [1]. Всего было выявлено 12 больных, 8 из которых имели возраст до 30 лет. Большинство случаев заболевания были диагностированы в конце июля и в августе, у 6 человек клиническая картина течения заболевания имела форму серозного менингита и менингоэнцефалита, также был зарегистрирован и 1 смертельный случай. При исследовании иксодовых клещей *H. marginatum* в преимаго был обнаружен вирус ЛЗН [5].

Первая зарегистрированная крупная вспышка на территории Российской Федерации произошла летом 1999 г. в Волгоградской области. Общее количество зарегистрированных случаев ЛЗН составило 380 человек, 10 % которых (38 человек) закончились летальным исходом [2]. С 1999 г. в России стали регулярно выявлять возбудитель ЛЗН и регистрировать случаи этого заболевания. В 2010 г. на территории России были зарегистрированы вспышки ЛЗН в Волгоградской, Ростовской и Воронежской областях, а также отдельные случаи заболеваний в Астраханской, Челябинской областях, Республике Калмыкия и в Краснодарском крае [4]. Общее количество заболевших составило 524 человека. В 2011 г. зарегистрировано 163 случая заболеваний ЛЗН в 10 регионах Российской Федерации.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследованы кровь, моча, ликвор больных людей с диагнозом лихорадка Западного Нила, аутопсийный материал от умерших больных ЛЗН, полевой материал (суспензии органов птиц, суспензии комаров, клещей, кровь лошадей), плазма здоровых доноров, плазма крови реконвалесцентов, перенесших нейротропную форму инфекции, а также биопробный материал — пробы головного мозга новорожденных мышей после интрацеребрального введения клинического материала.

Подготовку проб выполняли в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности», МУ 3.1.3.2600-10 «Мероприятия по борьбе с лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации», МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих — переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций».

Выделение РНК из плазмы крови проводили методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинизотиоцианата с использованием коммерческих наборов реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-преп» (ФБУН

ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Экстракцию РНК из проб органов и полевого материала проводили с применением комплекта реагентов «Рибо-золь-С» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) с последующим применением набора «РИБО-преп». Для более эффективного выделения РНК из больших объемов материала (1,5 и 5 мл) применяли набор «Магно-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием «Набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс WNV-FL» формат FRT производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия, согласно инструкции по применению.

Нами также были апробированы экспериментальные тест-системы — «Набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (ГенНил — РЭФ)», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и амплификационная тест-система с праймерами, фланкирующей фрагмент 5'UTR ВЗН, разработанная в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт.

Для проведения секвенирования использовали продукты амплификации, полученные в результате ПЦР с праймерами, фланкирующими участок 5'UTR-ProtC и фрагменты генов NS3 и ProtE вируса ЗН. Секвенирование производили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), для очистки продукта использовали набор BigDye Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США). Учет результатов провели на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила в период 2008—2011 гг. выполнено 914 исследований проб на наличие РНК возбудителя ЛЗН.

В 2008 и 2009 гг. проводился анализ проб сывороток крови от людей с подозрением на заболевание ЛЗН с использованием ПЦР. Из всех анализируемых проб (15) РНК ВЗН выделена лишь в 6 случаях.

В 2010 г. методом ПЦР исследовано 202 пробы как от больных ЛЗН, так и из объектов окружающей среды. РНК вируса обнаружена в 5 из 103 проб крови, 1 — из 28 проб ликвора, а также получено 4 положительных результата из 32 проб аутопсийного материала от 7 человек.

В 2011 г. референс-центром по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила начаты молекулярно-генетические исследования сывороток крови и мочи реконвалесцентов для установления персистенции ВЗН в организме людей, перенесших ней-

роинвазивную форму инфекции. Всего было выполнено 117 анализов, однако положительных результатов получено не было. Методом ПЦР в эпидсезон проведены выборочные исследования крови доноров Волгоградского областного центра крови на наличие РНК ВЗН. Исследовано 99 проб с отрицательным результатом. Совместно с ветеринарной службой начата работа по контролю инфицированности ЛЗН лошадей в Волгоградской области. При проведении 91 анализа положительные результаты не обнаружены.

По мере поступления материала из регионов Российской Федерации проводились исследования сывороток крови и ликвора от больных ЛЗН и объектов окружающей среды с помощью ПЦР-диагностики. В лабораториях института проведено 253 исследования материала от больных методом ОТ-ПЦР на наличие РНК ВЗН. В 43 случаях получен положительный результат. При исследовании 50 пулов комаров и 20 пулов клещей положительных результатов не выявлено.

Проведенные исследования показали, что для выделения РНК ВЗН наиболее удобным и эффективным является набор «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия. Однако при работе с большими объемами материала, для повышения чувствительности реакции РНК ВЗН, исследования необходимо дополнять применением набора «Магно-сорб».

При сравнении эффективности применения двух анализируемых тест-систем «АмплиСенс WNV-FL», выпускаемой в формате FRT и ГенНил — РЭФ, установлено, что ГенНил — РЭФ обладает меньшей чувствительностью (РНК ВЗН обнаружена в 7 из 52 положительных проб). Несмотря на это, экспериментальная тест-система ГенНил — РЭФ обладает высокой специфичностью и воспроизводимостью, удобна в применении и может быть использована как в практике здравоохранения, так и в научных исследованиях.

В лаборатории генной диагностики и типирования микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института сконструированы экспериментальные праймеры, фланкирующие фрагмент 5'UTR ВЗН. Данные олигонуклеотидные затравки на данный момент проходят внутрилабораторные испытания, по предварительным результатам которых чувствительность и специфичность оказалась близка к «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Для генотипирования вируса, обнаруженного в исследованном материале, проведено секвенирование фрагментов генома изолятов ВЗН 2011 г. от двух больных из Волгоградской и Воронежской областей. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей свидетельствовал об их принадлежности ко II генотипу вируса. Также II генотип определен при исследовании органов птицы из Волгоградской области. Полученные данные свидетельствовали о формировании очагов ЛЗН со II генотипом вируса в этих регионах. Полученные нами данные подтверждали расширение ареала этого

генотипа вируса, учитывая, что заболеваемость ЛЗН населения и на территории Ростовской области в 2010—2011 г. была вызвана вирусом генотипа II, аналогично некоторым странам Европы [3].

Последовательность нуклеотидов участка 5'UTR-protC, полученная в результате секвенирования пробы, выделенной из крови больного в 2011 г. (г. Воронеж), была депонирована в генетической базе данных GenBank (NCBI, США) под идентификационным номером JN627243. Последовательности участков 5'UTR-protC и фрагменты генов protE и NS3 из проб, выделенных из мочи больного в 2011 г. (Волгоград) были секвенированы и представлены на депонирование.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование молекулярно-генетических методов необходимо для осуществления постоянного мониторинга за возбудителем ЛЗН на территории Российской Федерации с целью своевременного планирования, корректировки профилактических мероприятий и проведения своевременной диагностики данного заболевания.

В связи с потеплением климата ожидается расширение ареала арбовирусных инфекций, возникновение природных очагов и появление клинических случаев ЛЗН в более северных территориях, что свидетельствует об актуальности внедрения новейших технологий в диагностическую практику при расшифровках вновь возникающих вспышек инфекционных заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко А. М., Чумаков М. П., Башкирцев В. Н. и др. Новые данные об изучении инфекции Западного Нила в СССР (в Астраханской области) // Материалы 15-й науч. сессии ИПВЭ АМН СССР. — М., 1968. — С. 175—176.
2. Онищенко Г. Г., Петров В. А., Тихонов Н. Г. и др. Современные аспекты изучения лихорадки Западного Нила на юге России. Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье: Сб. науч. трудов. / Н. Г. Тихонов (ред.). — Волгоград, 2000. — С. 152—157.
3. Платонов А. Е., Карань Л. С., Шопенская Т. А. и др. // Журн. микробиол. — 2011. — № 2. — С. 29—37.
4. Путинцева Е. В., Липницкий А. В., Алексеев В. В. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Т. 107. — С. 38—41.
5. Чумаков М. П., Беляева Н. К., Бутенко А. М., Марьянова Л. И. Вирус Западного Нила в СССР // Эпидемиология вирусных инфекций. — М., 1968. — Т. 12. — С. 365—373.
6. Smithburn K. C., Hughes T. P., Burke A. W., Paul J. H. // Am J Trop Med Hyg. — 1940. — P. 471—492.

## Контактная информация

**Антонов Валерий Алексеевич** — д. м. н., профессор, Волгоградский государственный медицинский университет, ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru