

*На правах рукописи*

ХАМИТОВА  
Ирина Викторовна

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ  
ПАРВОВИРУСА В19 В ОТДЕЛЬНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ  
РЕГИОНАХ**

03.02.02 – вирусология  
14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные руководители:**

**Лаврентьева Ирина Николаевна** – доктор медицинских наук

**Семенов Александр Владимирович** – доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Ведущая организация:**

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул.проф. Попова 15/17.

С диссертацией можно ознакомиться в в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования.**

Возбудитель парвовирусной инфекции (ПВИ) – парвовирус В19 (PVB19) проявляет тропность к клеткам эритроидного ростка костного мозга (прерывая эритропоэз), эмбриональным тканям печени, селезенки, сердца и кишечника; зрелым гранулоцитам, мегакариоцитам; эндотелиальным гладкомышечным клеткам сосудов, тканям плаценты; обладает тератогенным действием.

ПВИ может иметь тяжелые последствия для пациентов с иммунодефицитными состояниями (онкологические больные, ВИЧ-инфицированные, пациенты, перенесшие операцию по пересадке органов или костного мозга и др.). У таких пациентов парвовирусной инфекцией могут быть спровоцированы тяжелые формы анемии, скоротечный апластический криз, васкулиты, артриты, миокардиты, неврологические расстройства, гепатиты, отторжение трансплантатов. (Win N. et al., 2014; Yaguchi D. et al., 2015; Fritch S.A. et al., 2015; Escher F. et al., 2008; Marco H. et al., 2016; Bihari C. et al. 2013; Douvoyiannis M. et al., 2009; Invernizzi R. et al., 2016; Krishnan P. et al., 2015). К группе риска относятся и беременные женщины. При инфицировании женщины во время беременности PVB19 может вызвать анемию и миокардиты матери и плода, врожденные аномалии, водянку плода, мертворождения и аборт. (Bonvicini F. et al., 2017; Xiong Y.Q., et al. 2019; Nigro G., et al 1994).

Очевидное значение парвовирусная инфекция имеет в трансфузиологии. В связи с тем, что PVB19 не входит в список обязательных к тестированию инфекций и устойчив к применяемым методам обеззараживания препаратов крови, компоненты крови для трансфузии могут содержать PVB19 в концентрации, создающей опасность гемоконтактной передачи ДНК PVB19 (Элижбаева М.А. и др. 2011; Филатова Е.В. и др. 2012; Wei Zhang, et.al. 2012).

Наличие высокой доли (до 50% и выше) бессимптомных форм способствует распространению инфекции, а отсутствие официального учета случаев заболевания во многих странах не позволяет в полной мере оценить масштаб распространенности ПВИ и возможность инфицирования в группах риска.

Известно о существовании трех генотипов PVB19, различающихся структурой генома на 2 – 13%. При этом серологически они идентичны. Наибольшее распространение в мире имеет первый генотип (Jain A., et al. 2018; Ekman A., et al., 2007). На территории РФ (в том числе и на территории Северо-Западного Федерального округа) выделены и депонированы в GenBank последовательности ДНК PVB19, принадлежащие генотипу 1А (Лаврентьева И.Н. и др. 2013).

### **Степень разработанности темы исследования.**

В специальной литературе есть исследования, посвященные выявлению маркеров ПВИ, в основном, на ограниченных территориях (Тихонова Н.Т. и др. 2004), или в отдельных социально значимых группах – это доноры крови, организованные коллективы военнослужащих, беременные женщины (Антипова А.Ю. и др. 2015; Никишов О.Н. и др, 2018). Есть отдельные работы, посвященные выявлению ПВИ в группах риска (van Elsacker-Neile A., et al 1996; Moudgil A., et al 2001; Florea A., et al 2007; Douvoyiannis M., et al 2009; Azevedo K., et al 2009; Ермолович М.А. и др. 2011; Azadmanesh K. et al 2015; Xiong Y., et al 2019).

Однако, несмотря на очевидную медицинскую значимость, практически нет исследований, посвященных распространению ПВИ на популяционном уровне в разных географических регионах, выполненных одновременно, в стандартизованных условиях. Влияние инфицирования PVB19 на течение и прогноз основного заболевания у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями крови, представлено единичными работами в

зарубежной и отечественной научной литературе (Rahiala et al., 2013; Климович Н. Т., 2013; Duedu K.O., 2013; Manning L., 2012; Wildig J., 2006).

Аналогичная ситуация сложилась в области молекулярно-генетических исследований. В базе GenBank депонировано около 4900 нуклеотидных последовательностей участков генома парвовируса В19. Из них всего 31 – выделены на территории Российской Федерации, и 26 – секвенированы непосредственно российскими учеными (Антипова А.Ю. и др., 2012; Филатова Е.В. и др. 2012; Хамитова И.В. и др. 2018). Данных об изолятах, выделенных на территории Республики Казахстан, в международной базе GenBank не было представлено.

#### **Цель исследования.**

Охарактеризовать распространение и молекулярно-генетические особенности возбудителя ПВИ среди здоровых лиц и в группах риска разных географических регионов.

#### **Задачи исследования**

1. Оценить распространение ПВИ среди условно здоровых лиц в отдельных географических регионах (Европа, Средняя Азия, Западная Африка) на основе определения лабораторных маркеров инфекции (анти-PVB19 IgG-антитела, ДНК PVB19).
2. Выявить лабораторные маркеры ПВИ (IgM-антитела, IgG-антитела к PVB19, ДНК PVB19 в группах риска: среди лиц, страдающих хроническими анемиями, онкологическими заболеваниями, а также у ВИЧ-инфицированных лиц.
3. Определить влияние инфицирования парвовирусом В19 на течение и прогноз заболевания у больных хроническими анемиями, больных онкогематологического профиля.
4. Разработать алгоритм лабораторной диагностики ПВИ у лиц, страдающих вторичными иммунодефицитами, хроническими анемиями, онкогематологическими заболеваниями.
5. Провести филогенетический анализ изолятов PVB19, выделенных в разных географических регионах.

#### **Научная новизна исследования**

Получены новые знания о генотипах PVB19, циркулирующих в отдельных странах Евразии. Все проанализированные изоляты, выделенные в РФ, Республике Сербия и в Республике Казахстан, относятся к генотипу 1 субтипу 1А, с преобладанием геноварианта 1А1 или 1А2 в тех или иных обследованных популяциях. Впервые изучены геноварианты PVB19, циркулирующие на территории Республики Казахстан.

Получены новые сведения о распространении ПВИ на отдельных, географически удаленных друг от друга территориях: в Российской Федерации (Европейская часть Россия) и в Республике Сербия (Восточная Европа), в Республике Казахстан (Средняя Азия), в Гвинейской республике (Западная Африка). Впервые проведено сравнительное изучение распространения ПВИ среди населения отдельных стран в разных возрастных группах, определено соотношение серопозитивных PVB19 лиц мужского и женского пола. Показано, что формирование коллективного иммунитета PVB19 в разных регионах характеризуют как общие закономерности, так и различия, обусловленные социальными факторами.

Установлено, что в организованном коллективе (курсанты-военнослужащие) происходит активное формирование популяционного иммунитета за счет скрытой циркуляции вируса, что подтверждается выявлением лабораторных маркеров инфекции.

Получены новые сведения о частоте выявления маркеров ПВИ в группах риска – у больных онкологическими заболеваниями кроветворных органов, лиц, страдающих хронической анемией паразитарной этиологии, и установлено влияние инфицированности на течение и возможный прогноз основного заболевания.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Показана относительная гомогенность циркулирующих на территории Евразийского континента штаммов, принадлежащих одному геноварианту 1А; преобладание в обследованных популяциях субгенотипов 1А1 или 1А2, распределенных неравномерно на обширных территориях.

Установлена широкая распространенность ПВИ среди людей, проживающих в разных географических регионах, что демонстрирует ее убиквитарность и значимость.

Выявлена высокая вирусная нагрузка РVВ19 в образцах плазмы крови лиц из организованного коллектива в концентрации, которая создает опасность передачи возбудителя ПВИ при гемотрансфузиях.

Достоверно установлено, что инфицирование парвовирусом В19 может ухудшать течение заболевания больных онкогематологического профиля после проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, быть существенным фактором развития нейтро- и тромбоцитопений, фебрильных реакций на фоне посттрансплантационных нейтропений, замедлять восстановление количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови, нарушать приживление трансплантата, что показывает необходимость принятия мер, направленных на предупреждение передачи возбудителя по гемоконтактному механизму.

С высокой степенью достоверности доказано, что инфицирование парвовирусом В19 может отягощать течение малярии у детей, что позволяет обосновать необходимость проведения дифференциальной этиологической диагностики.

Для пациентов из групп риска разработаны алгоритмы лабораторной диагностики ПВИ.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Массовое лабораторное обследование населения, проведенное на географически удаленных друг от друга территориях, свидетельствует о широком распространении парвовирусной инфекции. Формирование коллективного иммунитета имеет как общие тенденции, так и обуславливается плотностью населения, длительностью и активностью социальных контактов.

2. Лабораторные маркеры ПВИ выявляются у лиц, страдающих хроническими анемиями и онкогематологическими заболеваниями. Инфицирование лиц из групп риска парвовирусом В19 может отягощать течение и ухудшать прогноз основного заболевания.

3. По результатам филогенетического анализа установлено, что на территориях Евразийского континента циркулируют изоляты РVВ19 генотипа 1А субгенотипов 1А1 и 1А2, как близкие по нуклеотидному составу (РФ, Республика Сербия), так и кластеризующиеся в отдельную эволюционную ветвь (Республика Казахстан).

#### **Личный вклад автора в получении результатов исследования**

Автору принадлежит ведущая роль в выполнении основных этапов исследования и обобщении полученных результатов; их анализе и статистической обработке; подготовке материалов для публикаций. Отдельные фрагменты работы проводились совместно с научным сотрудником лаборатории экспериментальной вирусологии к.б.н. Антиповой А.Ю., научным сотрудником лаборатории молекулярной иммунологии к.б.н. Останковой Ю.В., сотрудниками НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой: профессором, заведующим лабораторией трансплантологии д.м.н. Чухловиным А.Б. и врачом-гематологом отделения трансплантации костного мозга к.м.н. Аверьяновой М.Ю.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов проведенного исследования определяется соответствием его дизайна критериям доказательной медицины, анализом репрезентативных

объемом выборок условно здоровых и больных лиц (всего 2885 человека), достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием современных методов исследования и статистическим анализом данных, полученных в процессе проведения исследования (5467 клинико-лабораторных исследований).

По результатам исследования опубликовано 32 печатных работы, из них – 8 статей в реферируемых журналах ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в базу цитирования WoS; 4 статьи, входящие в базу Scopus, 1 – в РИНЦ.

Результаты диссертационной работы представлены в десяти докладах, которые доложены на 6 международных и всероссийских конференциях: на VII всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», Санкт-Петербург, 8 – 10 декабря 2015 г.; на международной конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 1 – 4 июня 2015 г.; на XI съезде ВНПОЭМП «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», г. Москва, 16 – 17 ноября 2017 г.; IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», г. Москва, 18 – 20 апреля 2017 г.; международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4 – 6 декабря 2018 г.; Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика», Санкт-Петербург, 11 – 12 октября 2018 г.; на XI Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика», Санкт-Петербург, 12 – 13 октября 2020 г.

#### **Реализация результатов работы**

1. Информационное письмо «Выявление случаев парвовирусной инфекции в Северо-Западном Федеральном округе и алгоритм лабораторной диагностики» (Санкт-Петербург, 2018. – 9 с.).
2. Аналитический обзор «Эпидемиологический надзор за корью и другими экзантемными инфекциями в Гвинейской республике и в странах Африки» (Санкт-Петербург, 2019. – 64 с.).
3. Заявка на патент на изобретение РФ: «Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса парвовирус В19 на основе двухэтапной ПЦР». Приоритет от 13.08.2019.
4. В международную базу данных GenBank депонированы 30 нуклеотидных последовательностей ДНК PVB19: MH534950, MH166338, MG779501, MG779500, MG711455, MF481196, MF408298, MF405142, MT543168, MN427876, MN150057, MK929648, MK929647, MK848594, MK761201, MK642628, MN150059, MN150058, MT543169, MT543170, MN814845, MT543163- MT543167, MT554167- MT554170.
5. Глава в монографии *Impact of coinfection of PV B19 on the course and prognosis of malaria caused by Plasmodium falciparum. / New features of current infections in the Republic of Guinea. Ed. by A. Yu. Popova. – St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2020. – P. 209-212.*
6. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре клинической лабораторной диагностики медико-биологического факультета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург).
7. Разработанный метод выявления ДНК PVB19 используется в практической работе научно-методического центра по эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами, отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний, а также центральной клинико-диагностической лаборатории ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

### Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 157 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 236 источников, в том числе 23 отечественных и 213 зарубежных, содержит 27 таблиц, 23 рисунка.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнялась с 2014 г. по июнь 2020 г. в лаборатории экспериментальной вирусологии, в лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции и центре коллективного пользования ФБУН «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; в лаборатории Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней Роспотребнадзора (г. Киндия, Гвинейская Республика), в национальном центре по надзору за корью и краснухой Республики Сербия. На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера».

Всего исследовано 2885 образца сыворотки и/или плазмы крови. Образцы получены из коллекций вирусологических лабораторий региональных центров по надзору за корью и краснухой в СЗФО, в Гвинейской Республике, в Республике Сербия, в лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции НИИЭМ имени Пастера, из клиники «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой». Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Характеристика групп обследованных лиц представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Числовая характеристика лабораторно обследованных групп

Характеристика группы	Количество
Образцы крови условно здоровых лиц, проживающих в Санкт-Петербурге	817
Образцы крови трудовых мигрантов из Республик Таджикистан и Узбекистан, находящихся в РФ по трудовой визе	114
Образцы крови условно здоровых лиц, проживающих в Республике Казахстан	480
Образцы крови условно здоровых лиц, проживающих в Республике Сербия	552
Образцы крови условно здоровых лиц, проживающих в Гвинейской Республике	321
Образцы крови ВИЧ-инфицированных лиц, полученные от пациентов ГКУЗ ЛО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» (Санкт-Петербург)	231
Образцы крови пациентов с алло-ТГСК из клиники «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой» (Санкт-Петербург)	54
Образцы крови пациентов госпиталя г. Фрия Гвинейской Республики с диагнозом «малярия»	316
<b>ВСЕГО</b>	<b>2885</b>

Исследование выполнено с использованием иммунологических, вирусологических, молекулярно-генетических и статистических методов. Перечень лабораторных исследований, проведенных в ходе выполнения работы, представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Проведенные лабораторные исследования

Название исследования	Количество исследований
Выявление IgM-антител к PVB19 в периферической крови	153
Выявление IgG-антител к PVB19 в периферической крови	2668
Выявление ДНК PVB19 в периферической крови методом ПЦР с помощью коммерческого набора реактивов	738
Определение вирусной нагрузки ДНК PVB19 методом ПЦР с помощью коммерческого набора реактивов	1878
Секвенирование PVB19	30
Всего исследований	5467

*Иммуноферментный анализ.* Качественное определение IgM-антител проводили диагностическим набором «Anti-Parvovirus B19 ELISA IgM» (EUROIMMUN, Германия), количественное и качественное определение IgG-антител к PVB19 – диагностическим набором «Anti-Parvovirus B19 ELISA IgG» (EUROIMMUN, Германия), согласно инструкции.

*Молекулярно-генетические методы.* Экстракцию нуклеиновых кислот (ДНК) из плазмы крови проводили, используя коммерческий набор «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, г. Москва), согласно инструкции производителя.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР).* Выявление и/или количественное определение ДНК PVB19, оценку вирусной нагрузки образцов и пулов при анализе чувствительности разрабатываемого метода проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на коммерческом наборе «АмплиСенс® Parvovirus B19-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва), согласно инструкции.

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: денатурация при 95<sup>0</sup>С в течение 5 минут → 30 – 40 циклов амплификации в режиме: 95<sup>0</sup>С – 20 – 40 сек, 55 – 65<sup>0</sup>С – 20 – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 – 90 сек → финальная элонгация при 72<sup>0</sup>С – 5 мин. Учет результатов ПЦР проводили визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1хТВЕ), окрашенном бромистым этидием. Для амплификации и секвенирования использовали специфические праймеры (Синтол, Россия). Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов брали из литературных источников (Zhi N. et al., 2004; Durigon E.L. et al., 1993; Shade R. et al., 1986), подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям (таблица 3).

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров, дополнительно использованные для секвенирования региона NS1/VP1 PVB19

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
PVB19 1F	CAATTGTCACAGACACCAGTA
PVB19 1R	ACTTAGCCAGTTGGCTATACCT
PVB19 2F	CCCGCGCTCTAGTACGCCCA
PVB19 2R	TTGCGGGGGCCAGCTTGTA



Продукт амплификации и секвенирующей реакции очищали двумя методами:

1. Методом спиртового осаждения в присутствии ацетата натрия.
2. Используя коммерческий набор реагентов Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany) согласно инструкции производителя.

Для оценки качества очистки продуктов амплификации высушенный осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера и визуально оценивали в 2% агарозном геле. Концентрацию ДНК измеряли по рекомендованной производителем стандартной методике на флюориметре Qubit 2.0.

#### *Секвенирование ДНК PVB19*

1. Для секвенирования использовались образцы плазмы с вирусной нагрузкой не менее  $10^2$  МЕ/мл. Очищенный фрагмент ДНК с концентрацией 50 – 100 нг использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров в трех повторностях для каждой пары праймеров каждого образца. Для реакции использовали праймеры PVB19, позволяющие анализировать регион NS1/VP1 (локус NS1 – VP1u), рекомендованный для гено- и субгенотипирования PVB19, протяженностью около 994 пар оснований (п.о.), согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту J35 (AY386330) (Zhi N., 2004), совместно с дополнительными праймерами (таблица 3).
2. Для дополнительного контроля образцов использовали две аналитические системы с соответствующими реагентами, использованными согласно инструкциям производителя: в генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., USA) и генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

*Филогенетический анализ.* Для определения принадлежности изолятов PVB19V к генотипам был выбран фрагмент генома, включающий по участкам NS1 и VP1 генов (локус NS1 – VP1u), 994 п.о. Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными последовательностями референсных образцов (Edison L., 1993). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW (Kumar S. et al., 2016). Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей (Neighbor-joining) с использованием "Maximum Composite Likelihood" модели, для оценки достоверности построенных деревьев был проведен бутстреп (bootstrap) для 1000 повторов.

*Статистическая обработка* данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc). Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона. В качестве показателя тесноты связи между количественными показателями  $x$  и  $y$ , имеющими нормальное распределение, использовался коэффициент корреляции  $r_{xy}$  Пирсона. Оценка статистической значимости корреляционной связи осуществлялась с помощью  $t$ -критерия. Значения коэффициента корреляции  $r_{xy}$  интерпретировались в соответствии со шкалой Чеддока. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности  $p < 0,05$ .

## **2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОТДЕЛЬНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

Анализировали распространенность ПВИ в разных когортах населения стран Восточной Европы (Российская Федерация и Республика Сербия), Средней Азии (Республики Казахстан, Узбекистан, Таджикистан), Западной Африки (Гвинейская Республика).

Учитывая, что методов специфической профилактики парвовирусной инфекции не разработано, а постинфекционные иммуноглобулины G к PVB19 сохраняются в крови переболевших пожизненно, о распространении ПВИ можно судить по показателям гуморального иммунитета. Достаточно долго (от нескольких недель до нескольких лет) сохраняется в плазме крови и ДНК вируса. Эти два лабораторных маркера были выбраны для оценки популяционного иммунитета (IgG-антитела) и для выявления случаев сравнительно недавно перенесенного заболевания (ДНК вируса).

Лабораторные маркеры инфекции были выявлены во всех обследованных когортах населения Санкт-Петербурга, трудовых мигрантов из стран Средней Азии, жителей Республики Казахстан и Гвинейской республики. При этом была отмечена общая тенденция повышения уровня серопревалентности к PVB19 в старших возрастных группах, что коррелирует с данными других авторов (Никишов О.Н и др. 2016; Kelly H.A. et al 2000; Mossong J. et al 2008) (таблица 4).

Таблица 4 – Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых лиц в отдельных географических регионах в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Доля IgG + к PVB19 (%), M±m				
	Санкт-Петербург (РФ) n=317	Республика Сербия n=552	Республики Таджикистан и Узбекистан (трудоу мигранты) n=114	г.Нур-Султан (Казахстан) n=480	Гвинейская Республика n=321
18 – 20	33,3±11,11	48,8±5,45	12,5±11,69	48,6±5,89	44,4±11,71
21 – 30	58,8±5,97	61,5±5,51	42,9±7,64	62,0±3,37	53,8±5,64
<b>18 – 30</b>	<b>53,5±5,38</b>	<b>54,9±3,91</b>	<b>38,0±6,86</b>	<b>58,6±2,94</b>	<b>52,1±5,10</b>
31 – 40	51,3±5,66	60,3±5,93	54,5±8,67	69,9±4,31	53,4±5,32
41 и старше	72,5±3,61	61,8±2,71	54,8±8,94	80,5±4,25	55,5±4,25
Всего	62,1±2,72	59,6±2,09	47,4±4,68	65,2±2,17	53,9±2,78

Вместе с тем были выявлены и существенные различия в формировании коллективного иммунитета к парвовирусу В19. Наибольшие показатели серопревалентности выявлены в городах Нур-Султане, Республика Казахстан (65,2±2,17%) и Санкт-Петербурге, РФ (62,1±2,72%) – городах с высокой плотностью населения, выраженными миграционными процессами; наименьшие – среди трудовых мигрантов из малонаселенных районов Узбекистана и Таджикистана (47,4±4,68%). Промежуточное положение заняли показатели серопревалентности к PVB19, полученные в Гвинейской Республике (53,9±2,78%) а также в Республике Сербия (59,6±2,09%).

Активному формированию коллективного иммунитета к PVB19 способствуют длительные тесные контакты. Высокие показатели серопревалентности регистрировали среди курсантов одного из военных училищ Санкт-Петербурга, где интенсивное формирование коллективного иммунитета к PVB19 (85,2% серопозитивных) регистрировали уже среди лиц 18 – 20 лет (таблица 5). Этот показатель существенно превышал показатель серопревалентности в той же возрастной группе условно здоровых жителей Санкт-Петербурга (33,3%). Интенсивное формирование коллективного иммунитета в организованном коллективе связано с наличием скрытой циркуляции возбудителя в данной популяции, что подтверждается наличием образцов с вирусспецифическими IgM, выявлением существенного количества ДНК-положительных проб (27,5%), и высококопийных образцов в группах 18 – 30-летних курсантов и преподавателей.

Таблица 5 – Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых лиц из организованного коллектива в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс.)	Из них IgG + к PVB19	
		Количество, (абс.)	Доля (%), M±m
18 – 20	223	190	85,2±2,38
21 – 30	173	145	83,8±2,80
31 – 40	64	60	93,8±3,03
41 и старше	40	34	85,0±5,65
Всего	500	426	85,8±1,56

В последние годы имеет место тенденция распространения инфекционных заболеваний, обусловленная активными миграционными процессами. В РФ ежегодно прибывает большое количество трудовых мигрантов из стран Средней Азии. При этом сведения о циркуляции возбудителей тех или иных инфекций, в том числе ПВИ, в этой группе, как правило, отсутствуют. В исследование включены образцы крови, полученные от трудовых мигрантов, прибывших в Санкт-Петербург из малонаселенных районов Республик Узбекистан и Таджикистан, что и объясняет меньшее количество серопозитивных к PVB19 лиц, по отношению к жителям мегаполисов (гг. Санкт-Петербург и Нур-Султан).

Мигранты с низким уровнем популяционного иммунитета, безусловно, являются мишенью для инфицирования PVB19. Скуденность проживания этих этнических общин, характерная для их пребывания в Санкт-Петербург, может способствовать активному распространению инфекции с вовлечением в инфекционный процесс чувствительных к инфицированию постоянных жителей города, в том числе доноров крови, беременных женщин, лиц с первичными и вторичными иммунодефицитами, больных анемиями, реципиентов крови и костного мозга, онкологических больных.

Особенностью формирования коллективного иммунитета к PVB19 являются выявленные в ряде регионов различия в доле серопозитивных мужчин и женщин.

В Республике Казахстан (г. Нур-Султан) гуморальный иммунитет к PVB19 более интенсивно формировался среди мужчин молодого возраста, а именно 18 – 20 лет. В этой же группе выявлена наибольшая доля ДНК PVB19-положительных образцов (23,6±5,0%), и наибольшее количество образцов с более высокой копийностью ДНК ( $\geq 1,0 \times 10^3$  ME/мл), что может являться показателем недавно перенесенной парвовирусной инфекции. Результаты свидетельствуют, видимо, об активной социальной роли молодых мужчин. Но в целом, в образцах крови женщин ДНК парвовируса B19 выявлялась несколько чаще, чем у мужчин (19,1±3,50% и 13,3±1,80% соответственно). Очевидно, этот факт объясняется более тесным контактом женщин с детьми в семьях, образовательных, учебных и лечебных учреждениях.

Гендерные различия выявлены и в Гвинейской Республике: установлено почти двукратное преобладание доли серопозитивных к PVB19 молодых мужчин по отношению к защищенным от инфекции женщинам в возрастной группе 18 – 20 лет (57,1% и 36,4% соответственно), что коррелирует с данными, полученными в Республике Казахстан (67,5% серопозитивных мужчин, 25,0% – женщин). Напротив, в России и Республике Сербия не выявлено гендерных различий среди серопозитивных лиц ни в одной из возрастных групп. Наличие гендерных различий при формировании коллективного иммунитета к PVB19 связано, видимо, с социокультурными особенностями той или иной страны.

Положительные по парвовирусу В19 образцы выявлялись во всех возрастных группах в каждом из изученных регионов. Наиболее часто ДНК РVВ19 выявлялась в образцах крови молодых людей до 20 лет (рисунок 1).

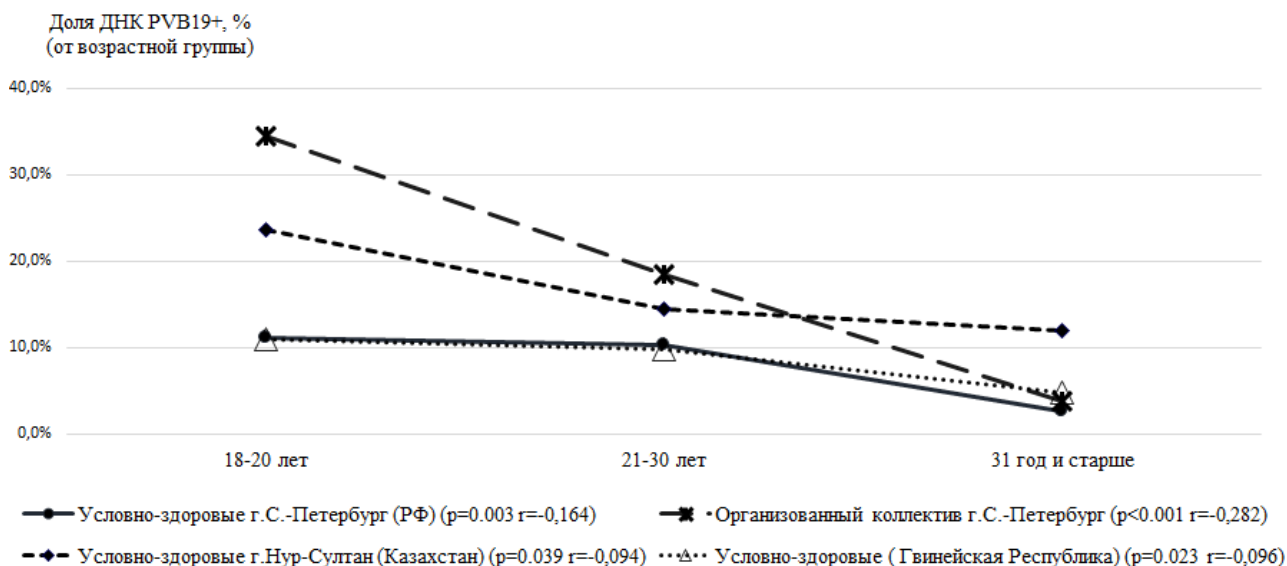


Рисунок 1 – Выявление ДНК РVВ19 в различных возрастных группах.

Таким образом, показана активная циркуляция парвовируса В19. Вместе с тем, наличие серонегативных к РVВ19 лиц во всех возрастных группах создает условия для распространения инфекции, в том числе и в группах риска.

Ранее было показано что, среди обследованных беременных женщин, проживающих в Санкт-Петербурге, около 50% чувствительны к заражению РVВ19 (Антипова А.Ю. и др., 2011). По результатам данного исследования, в Республике Казахстан не имеют защитных антител к РVВ19 75% женщин 18 – 20 лет, больше половины женщин 21-30 лет и более трети женщин 31 – 40 лет. Это несет большие риски инфицирования во время беременности. Поскольку среди девочек и девушек-подростков социальное взаимодействие может быть менее развито, в репродуктивном возрасте женщины, не имеющие антител к РVВ19, могут заразиться, учитывая более тесные профессиональные (образовательные, медицинские услуги) и семейные контакты с детьми. В целом, в Санкт-Петербурге, Республиках Сербия и Казахстан, Гвинеяской Республике более 50% женщин репродуктивного возраста не защищены от ПВИ.

В каждой возрастной группе каждой из исследованных когорт населения были выявлены серонегативные лица, что может способствовать вовлечению в инфекционный процесс как условно здоровых, так и пациентов с хроническими заболеваниями разной этиологии.

Полученные результаты подтверждают актуальность парвовирусной инфекции не только для детей и подростков, но и для взрослых. А выявление ДНК-РVВ19-положительных проб из образцов крови, полученных со всех изученных территорий, свидетельствует о повсеместной циркуляции парвовируса В19.

### 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МАРКЕРОВ ПВИ В ГРУППАХ РИСКА

Несмотря на низкую контагиозность (ИК составляет 15 – 30%), риск инфицирования может существенно повышаться при длительном контакте, особенно у иммунокомпрометированных лиц (например, в условиях стационаров); у пациентов с хроническими анемиями; при многократных гемотрансфузиях, пересадке органов и тканей.

Данный этап исследования был посвящен изучению влияния инфицирования PVB19 на течение и прогноз основного заболевания у онкогематологических больных (реципиенты крови и костного мозга), а также больных анемиями (паразитарная хроническая анемия).

На маркеры ПВИ были лабораторно обследованы 54 пациента НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой (возраст 0,6 – 19 лет), которым выполнялась аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Большинство детей и подростков (51 из 54) наблюдали в течение 2-х месяцев после алло-ТГСК.

В проведенном исследовании среднее содержание ДНК и уровни IgG-антител к PVB19 на момент трансплантации не коррелировали с возрастом пациентов, а также со статусом заболевания, общим состоянием пациентов и наличием дополнительных вирусных инфекций.

Вместе с тем, показана достаточно высокая частота выявления маркеров ПВИ в крови реципиентов алло-ТГСК. Несмотря на то, что антитела IgM к PVB19 не были обнаружены ни в одном из образцов крови, серопревалентность к PVB19 составляла 68,5 – 80,4%, что более чем в 2 раза выше, чем среди здорового населения той же возрастной категории (Тихонова Н.Т. и др 2004; Satake M. et al., 2011). Этот факт, вероятно, может объясняться и тем, что большинство пациентов в исследуемой группе имели в анамнезе более 10 гемотрансфузий и получали ВВИГ. Парвовирус В19, несомненно, представляет опасность для лиц, получающих иммуносупрессивную и цитостатическую терапию. Тем не менее, ПВИ отсутствует в перечне инфекций, рекомендованных ВОЗ к обязательному тестированию как для доноров крови, так и для доноров костного мозга (Deutsche Standards ZKRD, WHO 2009).

Полученные результаты обнаружения ДНК PVB19 в 28,0 – 30,4% случаев у пациентов до и после алло-ТГСК полностью согласуются с исследованием Rahiala et al. (Rahiala et al., 2013). Так же, как в данной работе, у пациентов с активацией вируса не было выявлено специфической клинической симптоматики, которую можно было бы трактовать как парвовирусную инфекцию. Выявлена достоверная корреляция между исходной вирусной нагрузкой (до алло-ТГСК) и уровнями IgG-антител к парвовирусу в разные сроки наблюдения. Наиболее отчетливо установлена зависимость между наличием ДНК PVB19 до алло-ТГСК и интенсивностью гуморального ответа через 60 суток после алло-ТГСК (до алло-ТГСК:  $r = 0,367$ ,  $p = 0,003$ ; на 30 день:  $r = 0,274$ ,  $p = 0,02$ ; на 60 день:  $r = 0,461$ ,  $p = 0,0004$ ).

Наличие ДНК парвовируса, выявленное как в исходных пробах, так и через 30 – 60 суток после алло-ТГСК, может быть причиной развития целого ряда неблагоприятных реакций. Так, получены достоверные свидетельства того, что инфицированность PVB19 может быть существенным фактором развития нейтро- и тромбопений ( $r = -0,422$ ;  $p = 0,002$ ;  $r = -0,422$ ;  $p = 0,001$  соответственно) (рисунок 2), фебрильных реакций после проведенной алло-ТГСК ( $p = 0,016$ ; RR = 1,478), замедлять восстановление количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови ( $r = -0,281$ ;  $p = 0,02$ ;  $r = -0,303$ ,  $p = 0,01$  соответственно), нарушать приживление трансплантата ( $r = 0,315$ ;  $p = 0,034$ ).

Медицинская значимость повышения уровня IgG к парвовирусу В19 для данной группы больных состояла в нарушении приживления трансплантата, которое, в целом, выявлялось чаще через 60 суток после алло-ТГСК ( $r = 0,315$ ;  $p = 0,034$ ;  $n = 46$ ). Это свидетельствует о возможной продукции специфических антител клетками памяти после перенесенной цитостатической терапии, то есть, о возможном бустер-эффекте при повторном инфицировании вирусом в процессе гемотрансфузии. Получены данные о важности определения уровней Ig G к PVB19 в динамике для прогнозирования возможной дисфункции трансплантата.

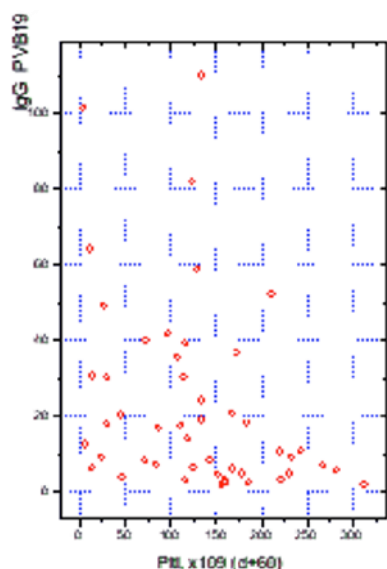


Рисунок 2а

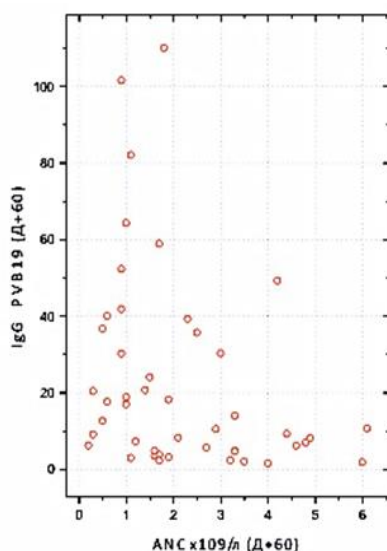


Рисунок 2б

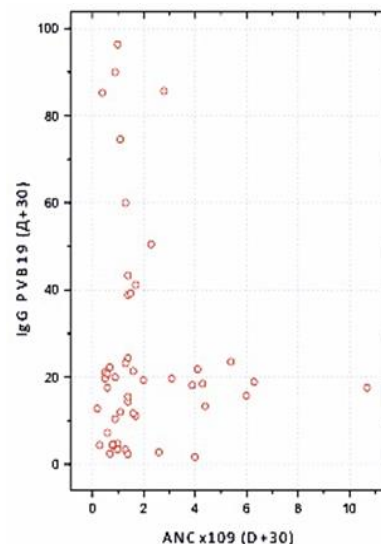


Рисунок 2с

Рисунок 2 – Корреляция между гематологическими показателями и уровнем IgG PVB19 у пациентов после алло-ТГСК. 2а. Зависимость числа тромбоцитов в крови на день +60 после алло-ТГСК и уровнями анти-PVB19 IgG ( $r = -0,422$ ;  $p = 0,001$ ); 2б. Отрицательная корреляция между содержанием числа нейтрофилов в крови на день +60 и уровнями анти-PVB19 IgG ( $r = -0,422$ ;  $p = 0,002$ ); 2с. Зависимость уровня нейтрофилов в крови на день +30 от уровней анти-PVB19 IgG ( $r = -0,380$ ;  $p = 0,003$ ).

В целом, полученные в данной группе больных результаты доказывают, что инфицирование парвовирусом В19 может существенно отягощать течение основного заболевания у пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Второй группой больных стали больные с хронической паразитарной анемией. Гематологические нарушения, связанные с инфекцией простейшим рода Plasmodium, широко распространены в местностях, эндемичных по малярии. Имеются данные, что тяжёлые формы анемии являются одной из главных причин детской смертности, составляя от 17 до 54% случаев (Newton C.R. et al. 1997; Slutsker L. et al., 1994). Эритроциты являются основной мишенью малярийного плазмодия, который размножаясь, разрушает их и вызывает анемию различной степени тяжести. При инфицировании PVB19 больных малярией ситуация может осложниться в связи с тем, что PVB19 способен прерывать эритропоэз, усугубляя течение основного заболевания.

Плазма крови больных неосложненной и осложненной формами малярии была исследована на наличие ДНК PVB19 (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние инфицирования PVB19 на течение малярии у больных префектуры Фрия (Гвинейская Республика)

Течение малярии	Количество больных, в том числе умерших абс / % $M \pm m$	Обнаружение ДНК PVB19	
		ДНК PVB19 + абс / % $M \pm m$	ДНК PVB19 - абс / % $M \pm m$
Неосложненное	177/56,0 $\pm$ 2,79	15/27,3 $\pm$ 2,75	162/62,1 $\pm$ 3,0
Осложненное в том числе <b>летальный исход</b>	139/44,0 $\pm$ 2,79 <b>8 / 2,53%</b>	40/72,7 $\pm$ 2,75 <b>6 / 10,9%</b>	99/37,9 $\pm$ 3,0 <b>2 / 0,8%</b>
Всего	316/100	55/17,4 $\pm$ 2,13	261/82,6 $\pm$ 2,13

В группе с коинфицированием PVB19 и *P.falciparum* показатели осложнений и смертности оказались существенно выше и наблюдались у 40 из 55 ( $72,7 \pm 2,75\%$ ) пациентов, причем в 6 случаях ( $10,9 \pm 4,40\%$ ) заболевание закончилось смертью. В группе больных малярией без ПВИ осложнения имели место у 99 из 261 больного ( $37,9 \pm 3,0\%$ ); из них умерло 2 ( $0,8 \pm 0,54\%$ ) человека. Таким образом, вероятность развития осложненного течения малярии при сочетанной инфекции достоверно выше, чем при отсутствии ПВИ ( $p < 0,0001$ ; RR = 1,917; 95% CI: 1,532 – 2,399).

В данном исследовании доказана выраженная негативная роль инфицирования PVB19 на течение малярии у детей младшего возраста (рисунок 3).

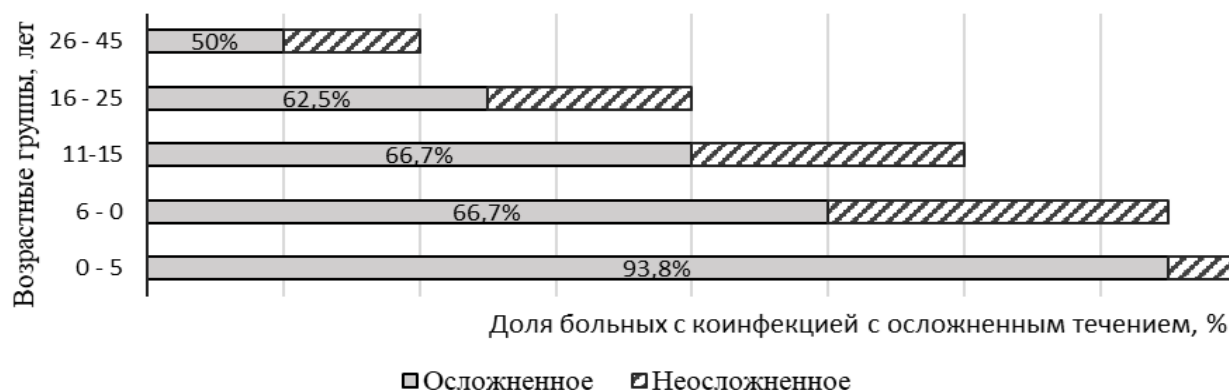


Рисунок 3 – Распределение неосложненного и осложненного течения малярии с сочетанной парвовирусной инфекцией в разных возрастных группах.

Среди обследованных больных малярией детей до пяти лет абсолютное большинство случаев сочетанной ПВИ –  $93,8 \pm 6,05\%$  от общего количества детей данной возрастной группы – сопровождалось осложнённым течением болезни и достоверно чаще приводило к смерти больного ( $p = 0,0003$ ; RR = 13,688; 95% CI: 3,034 – 61,740). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей по изучению сочетанной ПВИ – малярийной инфекции у детей в эндемичных по малярии регионах: среди детей до 5 лет абсолютное большинство случаев ПВИ сопровождалось осложнённым течением малярии (Duedu K.O. et al., 2013; Manning L. et al., 2012; Wildig J. et al., 2006), что свидетельствует о высокой медицинской значимости парвовирусной инфекции для стран, эндемичных по малярии.

Следует отметить, что особенностью, выявленной в некоторых группах риска, например, у детей с онкогематологическими заболеваниями, было отсутствие в образцах крови IgM-антител к PVB19. При этом обнаруживались специфические IgG-антитела к PVB19 и ДНК вируса, что свидетельствует о наличии инфекционного процесса. Очевидна необходимость применения специальных алгоритмов лабораторного обследования больных из групп риска на маркеры ПВИ, отличающихся от общепринятых протоколов диагностики большинства инфекционных заболеваний, согласно которым наличие IgM-антител в клинических образцах трактуется как показатель острой инфекции и определяется в первую очередь.

Разработке специальных алгоритмов обследования на ПВИ в группах риска с учетом особенностей развития и проявления инфекции в каждой группе посвящен отдельный фрагмент настоящего исследования. Для каждой группы риска был определен основной клинический или лабораторный показатель, медицинская процедура или физиологическая характеристика больного, исходя из которых исследование на ПВИ является целесообразным.

Для пациентов онкогематологического профиля основанием обследования на ПВИ является процедура алло-ТГСК, которая планируется или проводится данному больному (рисунок 4).



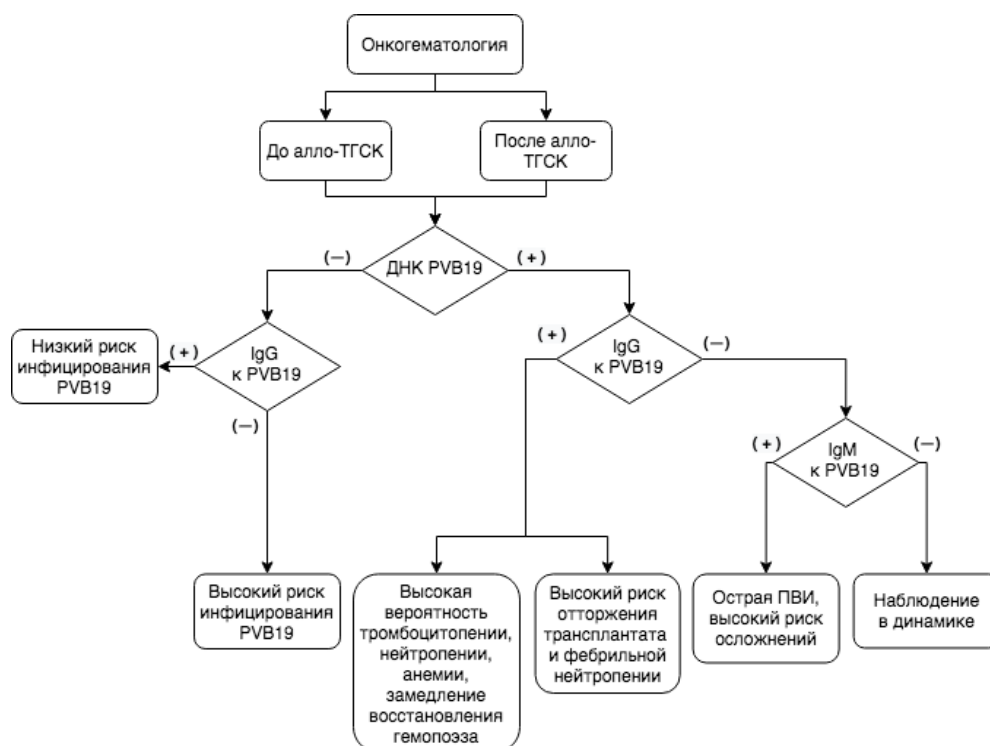


Рисунок 4 – Схема обследования больных онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК, на маркеры ПВИ.

Основопологающим фактором обследования больных малярией является возраст больного, так как именно у детей младшего возраста коинфицирование малярийным плазмодием и парвовирусом В19 может явиться фатальным (рисунок 5).

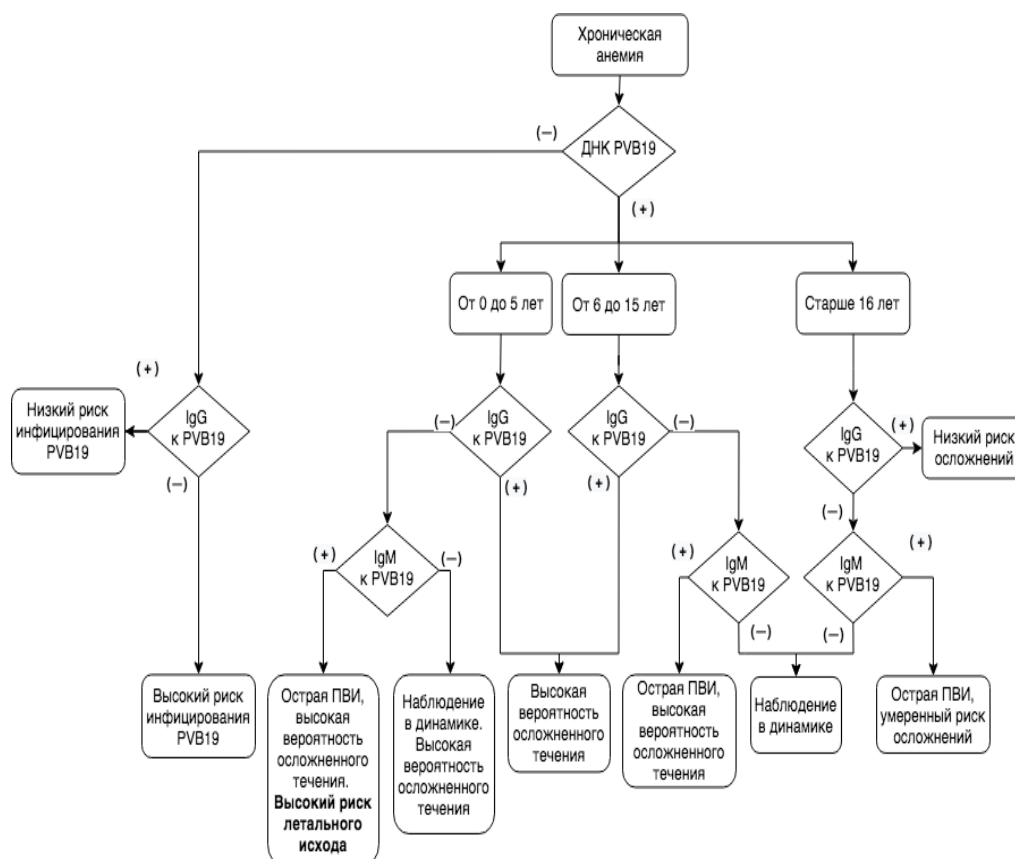


Рисунок 5 – Схема обследования больных с хронической анемией (паразитарной этиологии) на маркеры ПВИ.



Использование предложенных алгоритмов диагностики ПВИ в группах риска может способствовать выявлению причин неблагоприятного развития основного заболевания, связанных с инфицированием PVB19, и своевременной коррекции применяемой терапии.

#### 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ PVB19

Сведения о распространенных в данных регионах генотипах PVB19 в специальной литературе немногочисленны, что послужило основанием для филогенетического анализа геновариантов парвовируса B19, изолированных в отдельных странах.

На основании генетического анализа парвовируса B19 выделяют генотипы 1A, 1B, 2, 3A, 3B, которые имеют различное территориальное распространение. Генотип 1 является наиболее распространенным геновариантом PVB19.

Для выявления и типирования PVB19 при низких концентрациях был разработан способ выявления в биологическом материале ДНК в низкокопийных образцах плазмы. Прототипом явился «Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР» (патент №2016144898 РФ, заявление от 15.11.2016). Разработанный в рамках данной работы способ заключается в применении «гнездовой» ПЦР с использованием на первом этапе асимметричной амплификации на олигонуклеотидах, фланкирующих геном вируса за исключением инвертированных концевых повторов, а на втором этапе – нескольких пар праймеров, фланкирующих различные регионы генома вируса согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту J35 (AY386330) (Zhi N. et al 2004). В исследование были включены 30 изолятов PVB19, выделенные в период 2012 – 2020 гг. в России (СЗФО), Республике Сербия и Республике Казахстан (г. Нур-Султан).

Нуклеотидные последовательности девяти изолятов PVB9, полученных в СЗФО РФ, депонированы в международную базу данных GenBank (MN534950, MN166338, MG779501, MG779500, MG711455, MF481196, MF408298, MF405142, MT543168) и отнесены к генотипу 1 субтипу 1A. Семь изолятов, использованных для установления филогенетических связей, разделились на две подгруппы: 6 изолятов (85,7%) отнесены к подгруппе 1A2, один изолят – к подгруппе 1A1. Изоляты MF405142, MG779500, MG779501 оказались сходны с различными изолятами из Нидерландов, Финляндии, Германии; MF481196, MG711455, MF408298 – с изолятом из Албании. Последовательности, полученные в настоящем исследовании, тесно связаны последовательностями ДНК PVB19, обнаруженными в работах других исследовательских групп: в 2010 – 2011 гг. на территории СЗФО и в 2005 – 2011 гг. на территории Российской Федерации. Эти данные свидетельствуют о продолжающейся вирусной циркуляции. Однако некоторый уровень кластеризации вирусов по годам может указывать на повторные вирусные ввозы или обновляющийся резервуар патогена (рисунок 5а).

При филогенетическом анализе 12 образцов, выделенных на территории Республики Казахстан (MN427876, MN150057, МК929648, МК929647, МК848594, МК761201, МК642628, MN150059, MN150058, MT543169, MT543170, MN814845) (рисунок 5b), было показано, что все проанализированные изоляты так же принадлежат к генотипу 1A. При этом 11 изолятов (91,7%) отнесены к подгруппе 1A1, 1 изолят (8,3%) – к подгруппе 1A2. Образцы подгруппы 1A1, в свою очередь, распределены в две ветви, причем образцы одной ветви со сходством нуклеотидных последовательностей  $98,6 \pm 0,28\%$  сходны также с образцами, ранее выявленными в странах Западной Европы (Нидерланды, Франция, Швейцария). Вторая ветвь представляет собой кластер изолятов, нуклеотидные последовательности которых при попарном сравнении показали сходство в  $99,3 \pm 0,21\%$  и отличались от представленных в международной базе образцов GenBank. Особое внимание обращает на себя кластер,

включающий изоляты MN150059, MK929648, MN150057, MK848594. Отсутствие высокого сходства нуклеотидных последовательностей с представленными в международной базе GenBank образцами в указанном кластере при тесной связи внутри кластера, с высокой долей вероятности свидетельствует о независимой эндемичной циркуляции вируса в данном регионе.

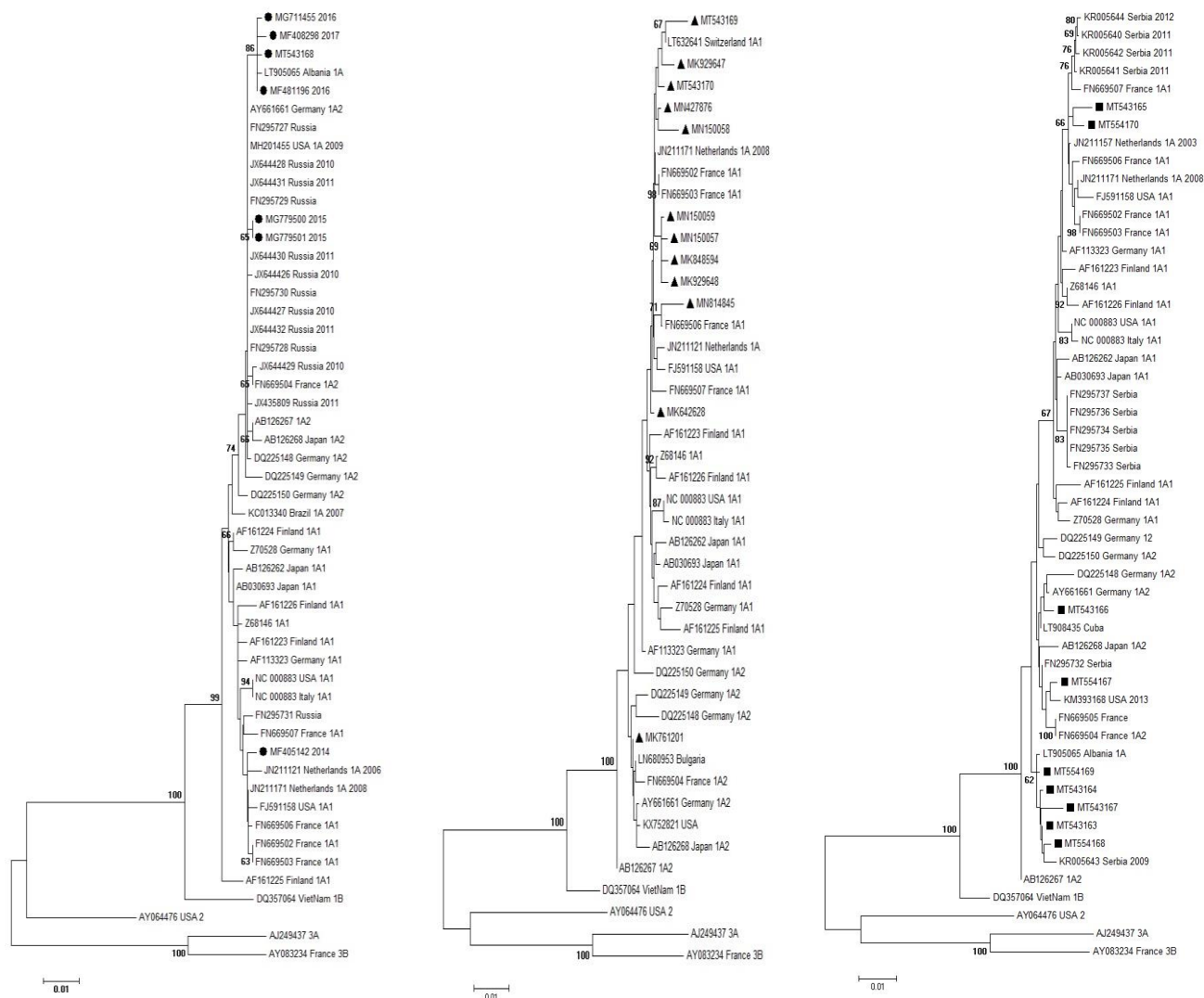


Рисунок ба

Рисунок бб

Рисунок бс

Рисунок 6 – Дендрограммы, характеризующие филогенетические отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными из образцов крови условно здоровых лиц: ба – в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (●), бб – в Республике Казахстан (▲) и бс – в Республике Сербия (■) в сравнении с представленными в международной базе данных Gene Bank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами Gene Bank с указанием генотипа, региона происхождения и даты сбора материала. Даны значения bootstrap  $\geq 60$ .

По результатам филогенетического анализа изолятов, полученных на территории Республики Сербия (рисунок 5с), установлено, что все девять последовательностей так же принадлежат к генотипу 1А и разделяются на две подгруппы: семь изолятов (77,8%) отнесены к подгруппе 1А2, два изолята – к подгруппе 1А1. Среди образцов генотипа 1А2 можно отметить пять изолятов (MT554168, MT554169, MT543163, MT543164, MT543167),

кластеризующихся с ранее описанными изолятами из Албании и Республики Сербия. При оценке нуклеотидной идентичности исследованных изолятов сходство составило 99,5%. Отмечается сходство этих изолятов с образцом KR005643 (субтип 1A2), выделенным в 2009 году, и являвшимся ранее единственным представленным в GenBank изолятом, полученным с территории Республики Сербия. Два других изолята (FN295733, FN295737), полученные в 2011–2012 годах, отнесены к субтипу 1A1. В данном исследовании не выявлено генетически близких с ними последовательностей ДНК PVB19. Предположительно, это может быть связано с развитием экономических связей и миграционных процессов и, как следствие, импортированием ранее не характерных для данной территории геновариантов.

В целом, все выявленные в настоящем исследовании изоляты из России, Республик Сербия и Казахстан, относятся к генотипу 1A. В каждой группе обнаруживались изоляты как подгруппы 1A1, так и подгруппы 1A2 с преобладанием того или иного субгенотипа в популяции. При сравнении последовательностей ДНК PVB19, обнаруживается сходство изолятов PVB19 в каждой из подгрупп (1A1 и 1A2) (рисунок 7).

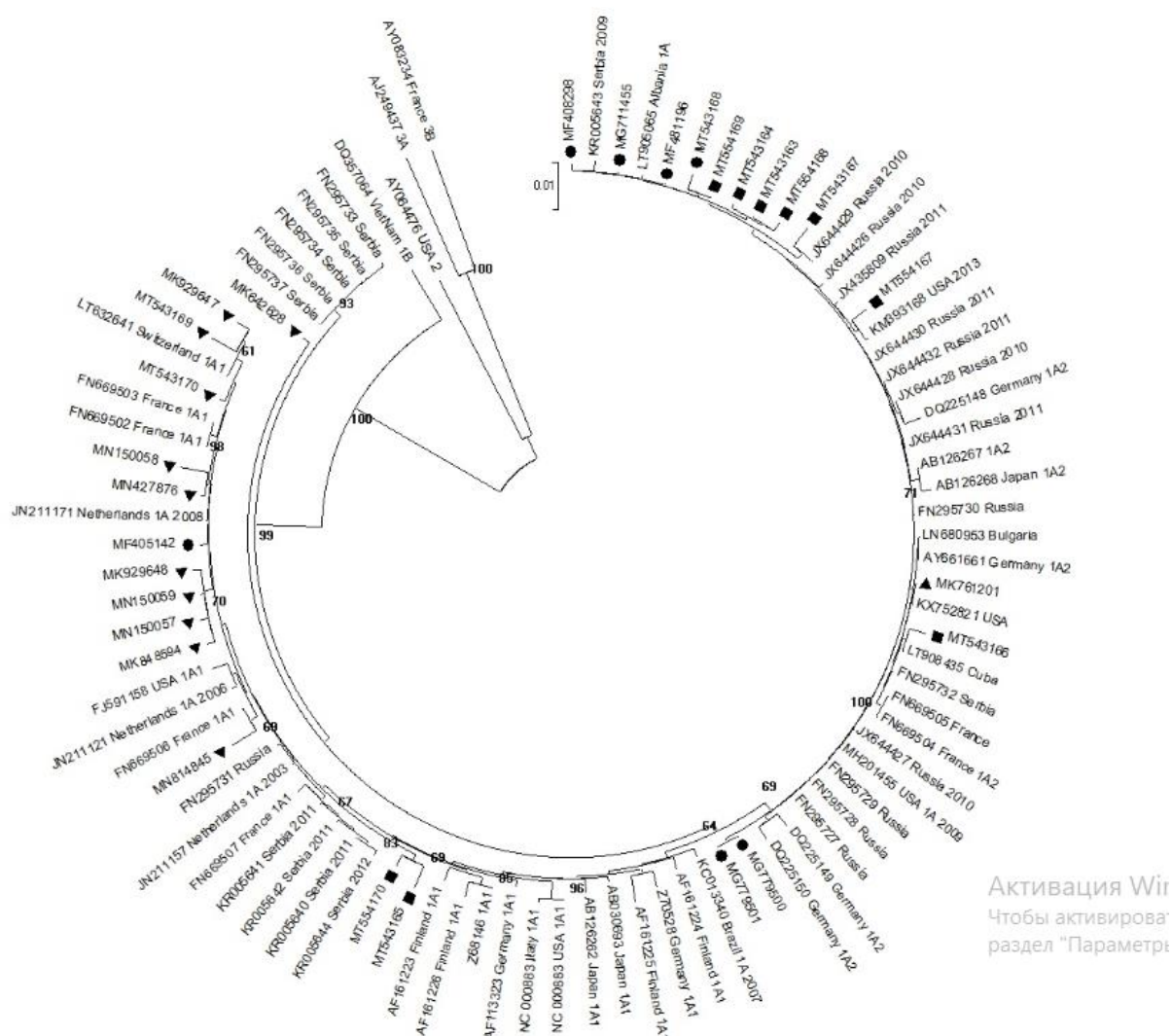


Рисунок 7 – Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными из образцов крови условно здоровых лиц в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (●), Республике Казахстан (▲) и Республике Сербия (■) в сравнении с представленными в международной базе данных Gene Bank референсными последовательностями. Даны значения bootstrap  $\geq 60$ .

Выявление близких по нуклеотидному составу изолятов в пределах субтипа на территориях из разных географических регионов может означать общее происхождение изолятов, а также свидетельствовать об общих путях передачи, связанных с развитием культурно-экономических связей и взаимодействий.

Полученные результаты корреспондируются с результатами работ других исследователей, согласно которым генотип 1 является наиболее распространенным геновариантом PVB19. Изоляты, принадлежащие к генотипу 1А, постоянно циркулируют в разных странах мира от Японии и США до стран Центральной, Западной и Восточной Европы (Германия, Франция, Италия, Албания, Финляндия, Россия, Республика Сербия) (Stewart G.C. et al., 2011; Servant S. et al., 2002; Jain A. et al., 2018; Jia J. et al. 2016).

Однако в данном исследовании выявлены и некоторые географические различия в распределении субтипов 1А: преобладание изолятов субтипа 1А1, полученных в Республики Казахстан и, напротив, изолятов субтипа 1А2, выделенных из образцов крови жителей России и Республики Сербия. Особое внимание обращает на себя кластер подтипа 1А1, включающий последовательности ДНК PVB19, изолированные в Республике Казахстан, и депонированные в коллекцию GenBank под номерами MT543169, MK929648, MN150057, MK848594, MN150059. Эта группа представлена изолятами, практически не показанными где бы то ни было ранее, что является генетическим свидетельством их эндемичности для территории Республики Казахстан и отсутствия (по каким-то причинам) распространения изолятов данного кластера за пределы географического ареала.

Парвовирус PVB19 является активно циркулирующим вирусом, который обеспечивает широкое распространение обусловленной им инфекции в разных странах мира как среди условно-здоровых лиц, так и в группах риска. Инфицирование парвовирусом В19 пациентов, страдающих гематологическими заболеваниями и иммунодефицитами, с высокой степенью достоверности коррелирует с отягощением течения основного заболевания. В условиях естественного распространения изоляты PVB19 имеют, в целом, достаточно высокую степень гомологии.

ПВИ – убиквитарное инфекционное заболевание. Широкое распространение, преимущественно доброкачественное, самоограничивающееся клиническое течение обычно приводят к снижению оценки вклада данной инфекции в развитии той или иной патологии. Однако ПВИ связана с большим диапазоном клинических проявлений, которые зависят от результатов взаимодействия между патогенетическим потенциалом вируса и физиологическим и иммунным статусом инфицированных людей. PVB19 является возможным этиологическим агентом разнообразных заболеваний, охватывающих практически все органы и системы организма. Все это подтверждает высокую медицинскую значимость парвовирусной инфекции.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что лабораторные маркеры ПВИ (IgG-антитела, ДНК PVB19) определяются во всех обследованных группах населения Восточной Европы, Средней Азии, Западной Африки, что подтверждает убиквитарный характер инфекции. Установлена общая тенденция повышения доли серопозитивных к PVB19 среди лиц старших возрастов во всех изученных группах населения. Показана активная циркуляция парвовируса В19 среди людей молодого возраста – ДНК PVB19 наиболее активно выявлялась среди лиц до 30 лет.
2. Доказано, что коллективный иммунитет к PVB19 наиболее активно формируется в условиях длительного тесного контакта: в организованном коллективе С.-Петербурга доля серопозитивных к PVB19 лиц составила 85,8%, достоверно превышая аналогичный

показатель среди жителей города (62,1%). На формирование коллективного иммунитета оказывают влияние социальные факторы: доля серопозитивных к PVB19 лиц из малонаселенных районов Средней Азии составила 47,4%, что достоверно ниже, чем у жителей Санкт-Петербурга и г. Нур-Султана (62,1 – 65,2%); преобладание доли серопозитивных к PVB19 мужчин по отношению к серопозитивным женщинам до 20 лет (в 2,7 и 1,6 раза, соответственно) выявлено в Республике Казахстан и в Гвинейской Республике.

3. Показано влияние инфицирования PVB19 на развитие нейтро- и тромбопений ( $r = -0,422$ ;  $p = 0,002$ ,  $r = -0,422$ ;  $p = 0,001$ , соответственно), ранних фебрильных нейтропений ( $p = 0,016$ ;  $RR = 1,478$ ); на восстановление количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови ( $r = -0,281$ ;  $p = 0,02$ ;  $r = -0,303$ ,  $p = 0,01$  соответственно), успешность приживления трансплантата ( $r = 0,315$ ;  $p = 0,034$ ;) у детей после алло-ТГСК, страдающих онкогематологическими заболеваниями.

4. Доказано выраженное влияние инфицирования PVB19 на течение малярии у детей младшего возраста. Среди обследованных больных малярией детей до пяти лет абсолютное большинство случаев сочетанной ПВИ ( $93,8 \pm 6,05\%$  от группы до 5 лет) сопровождалось осложнённым течением основного заболевания и достоверно чаще приводило к смерти больного ( $p = 0,0003$ ;  $RR = 13,688$ ;  $95\% \text{ CI: } 3,034 - 61,740$ ).

5. Для пациентов из групп риска целесообразно использование разработанных в настоящем исследовании алгоритмов лабораторной диагностики ПВИ, основанных на особенностях проявления инфекции в каждой группе.

6. На основании генотипирования и филогенетического анализа изолятов получены данные о циркуляции PVB19 генотипа 1A субгенотипов 1A1 и 1A2 на территории Российской Федерации, республики Казахстан и Республики Сербия, распределенных неравномерно на обширных территориях. Выявлены близкие по нуклеотидному составу изоляты в пределах субтипа на территориях из разных географических регионов (РФ и Республики Сербия), что может означать общее происхождение изолятов. Вместе с тем, выявлена группа изолятов (Республика Казахстан), кластеризующихся в отдельную ветвь с высокой степенью гомологии, что может свидетельствовать о независимой эволюции вируса в данном регионе.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В клинической практике для пациентов из групп риска рекомендуется использовать разработанные алгоритмы лабораторной диагностики ПВИ, основанные на особенностях проявления инфекции в каждой группе
2. Рекомендуется включить исследование крови доноров на маркеры ПВИ в перечень обязательных исследований, что позволит предупредить гемоконтактное заражение реципиентов.
3. В очагах ПВИ необходимо выявлять контактных людей из групп риска. Рекомендуется проводить динамическое клиничко-лабораторное наблюдение за контактными по инфекции беременными женщинами для своевременной диагностики возможного инфицирования плода и проведения терапии, направленной на предупреждение рождения детей с врожденной ПВИ.
4. Для выделения изолятов парвовируса В19 из клинических образцов с низкой концентрацией ДНК, целесообразно использовать метод двухгнездовой ПЦР.



## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Требуют дальнейшей разработки эпидемиологический надзор за парвовирусной инфекцией, диспансерно-динамическое наблюдение и клинико-лабораторное обследование на маркеры ПВИ лиц из групп риска, что существенно расширит возможности профилактики инфекции. Разработка коммерчески доступных отечественных ИФА тест-систем для серодиагностики ПВИ будет способствовать проведению подобных исследований.

Внедрение скрининга В19 от пациентов с лихорадкой/сыпью представит значимую информацию о распространенности парвовирусной инфекции в РФ, что имеет особое значение в период реализации программы ВОЗ по элиминации кори/краснухи в мире.

Выявление новых мутаций вируса и дальнейший анализ их возможных взаимосвязей с течением заболевания может помочь в разработке лекарств, а также в разработке эффективной вакцины против парвовируса В19.

Систематическое применение молекулярной филогенетики при анализе изолятов парвовируса В19 будет способствовать пониманию эпидемиологии инфекционного процесса, выявлению особенностей распространения вируса и его геновариантов.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Антипова А. Ю., Никишов О. Н., **Хамитова И.В.**, Семенов А. В., Бичурина М. А., Кузин А.А., Лаврентьева И.Н. Скрининговое исследование плазмы крови доноров на маркеры парвовирусной инфекции *Инфекция и иммунитет*. – 2015. – Т. 5, №2. – С. 171-174 <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-2-171-174>
2. Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рощина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., **Хамитова И.В.**, Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И. Инфицированность трудовых мигрантов из средней азии и постоянных жителей Санкт-Петербурга возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним. *Инфекция и иммунитет*. 2018;8(1):61-70. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-1-61-70>
3. **Khamitova I.V.**, Lavrentyeva I.N., Averyanova M.Yu., Chukhlovin A.B., Zubarovskaya L.S., Afanasyev V.V. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2018. Т. 7. № 1. С. 36-43. <https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2018-7-1-36-43>
4. I.N. Lavrentyeva, **I.V. Khamitova**, A.V. Slita, A.E. Levkovski, A.A. Diallo, A.K. Diallo, T.C. Sow, E.V. Naydenova, D.A. Agafonov, A.M. Senichkina. Impact of coinfection of PVB19 on the course and prognosis of malaria caused by Plasmodium Falciparum. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet* 2018, vol. 8, no. 3, pp. 383–387 <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-383-387>
5. **Хамитова И.В.**, Останкова Ю.В., Антипова А.Ю., Семёнов А.В, Лаврентьева И.Н. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19, циркулирующих на территории Северо-Западного федерального округа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018, №6, С. 55-66. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-55-61>
6. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., **Хамитова И.В.**, Никишов О.Н., Кузин А.А. Маркеры парвовирусной инфекции у лиц с экзантемными заболеваниями и в группах риска. *Журнал инфектологии*. 2019;11(3):110-117. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-3-110-117>
7. Лаврентьева И.Н., **Хамитова И.В.**, Samara J., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Magassouba F.N., Никишов О.Н., Кузин А.А., Семенов А.В. Состояние гуморального иммунитета к парвовирусу В19 у населения отдельных географических регионов. *Журнал*

микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(3):233-241. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-5>

8. Никишов О.Н., Кузин А.А., Зобов А.Е., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Останкова Ю.В., **Хамитова И.В.**, Результаты исследования распространённости и активности циркуляции парвовируса В19 (Parvoviridae, Parvovirinae, Erythroparvovirus, Primate erythroparvovirus 1) среди социально значимых категорий населения. // Вопросы вирусологии – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 143-149. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-143-149>

9. Антипова А.Ю., **Хамитова И.В.**, Лаврентьева И.Н. Состояние гуморального иммунитета к парвовирусу В19 у детей и подростков в некоторых географических регионах. // XI Всероссийский ежегодный конгресс «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» Санкт-Петербург, 12-13 октября 2020 г., / Материалы XI всероссийского ежегодного конгресса. – СПб., 2020 – С. 31.

10. **И.В. Хамитова**, А.В. Семенов, Е.Б.Зуева Д. Камара И.Н. Лаврентьева Изучение гуморального иммунитета к парвовирусу В19 у населения Гвинейской Республики. Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины 11-13 сентября 2019. г.Москва 2019 С.161

11. **Khamitova I.V.**, Antipova A.Yu., Averyanova M.Yu., Levkovskiy A.E., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Chukhlovin A.B., Lavrentieva I.N. Detection of parvovirus infection markers in risk groups// Abstract of International conference, dedicated to the 110<sup>th</sup> anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95<sup>th</sup> anniversary of naming the Institute after Pasteur // *Russian Journal of Infection and Immunity (Infectsiya i immunitet)*. 2018; 8(4): 528-529.

12. **Хамитова И.В.**, Лаврентьева И.Н., Аверьянова М.Ю., Зубаровская Л.С., Чухловин А.Б., Афанасьев Б.В. Вирусная нагрузка и частота выявления парвовируса В19 при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Тезисы V всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» 29-30 ноября 2018 // Вестник гематологии. 2018. Т.14, № 4. С.52-53.

13. Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., **Khamitova I.V.**, Vichurina M.A. Parvovirus infection: dissemination, medical-social significance// Abstract of International conference, dedicated to the 110<sup>th</sup> anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95<sup>th</sup> anniversary of naming the Institute after Pasteur // *Russian Journal of Infection and Immunity (Infectsiya i immunitet)*. 2018; 8(4): 531.

14. Антипова А.Ю., **Хамитова И.В.**, Останкова Ю.В., Никишов О.Н., Михеева Е.А., Семёнов А.В., Лаврентьева И.Н. Генетическое разнообразие изолятов парвовируса В19, выделенных на территориях Северо-Западного федерального округа России в 2014 – 2017 годах //Материалы Научно-практической конференция «Актуальные вопросы Государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Вооружённых силах Российской Федерации» 20-21 ноября 2018.- С.2

15. **Хамитова И.В.**, Аверьянова М.Ю., Антипова А.Ю., Зубаровская Л.С., Чухловин А.Б., Лаврентьева И.Н. Выявление маркеров парвовирусной инфекции у детей при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Материалы конгресса с международным участием «Здоровые дети - будущее страны» 24-25 мая 2018 года г. Санкт-Петербург. Детская медицина Северо-Запада 2018/ Т. 7 № 1 С. 332-333

16. **Хамитова И.В.**, Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.В. Скрининговое обследование доноров Казахстана на маркеры парвовирусной инфекции. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе

крови». 20-21 октября 2016 г., Санкт-Петербург / Вестник гематологии. – 2016. – Т.ХІІ – №4 – С.59-60.

17. **Хамитова И.В.**, Антипова А.Ю., Семёнов А.В., Лаврентьева И.Н. Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции у лиц с вторичными иммунодефицитами. Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием Москва, 28-30 марта 2016г / Инфекционные болезни.-2016.-Т.14, Приложение №1. – С.294.

#### **Список сокращений и условных обозначений**

1. Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
2. ВВИГ – внутривенные иммуноглобулины
3. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
4. ВОЗ, WHO - Всемирная организация здравоохранения
5. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
6. ИК –индекс контагиозности
7. ИФА – иммуноферментный анализ
8. НК – нуклеиновая кислота
9. РФ –Российская Федерация
10. Нт – нуклеотид
11. ПВИ - парвовирусная инфекция
12. СЗФО - Северо-Западный федеральный округ
13. П.о. - пары оснований
14. ПЦР - полимеразная цепная реакция
15. IgG, IgM - иммуноглобулин G, M
16. PVB19 - Human parvovirus B19, парвовирус B19



Хамитова, И.В. Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции и молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19 в отдельных географических регионах: автореф. диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.02.02, 14.03.10 / Хамитова Ирина Викторовна. – Санкт-Петербург, 2021. – 24 с.

Подписано в печать \_\_\_\_\_ г. Формат бумаги 60X84/16

Бумага офсетная. 1.0 усл. печ. л. Тираж 70 экз.

Печать цифровая. Заказ № \_\_\_\_\_