

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА»

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Лаврентьева Ирина Николаевна

доктор биологических наук

Семенов Александр Владимирович

Санкт-Петербург

2020 г

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРВОВИРУСА В19, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1 Парвовирус В19	14
1.1.1 Структурно-функциональная организация генома РVВ19	14
1.1.2 Географическое распределение генотипов РVВ19	22
1.2 Распространение и патогенез парвовирусной инфекции	26
1.3 Клинические проявления и медицинская значимость.....	32
1.4 Парвовирусная инфекция в группах риска.....	40
1.4.1. Лица, не имеющие иммунитета к ПВИ	40
1.4.2. Больные с иммунодефицитными состояниями	41
1.5 Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции	45
1.5.1 Серологические методы диагностики РVВ19.....	45
1.5.2 Молекулярно-биологические методы диагностики РVВ19	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1 Материалы исследования	49
2.2 Методы исследования	50
ГЛАВА 3 РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОТДЕЛЬНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ.....	56
3.1 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови условно здоровых жителей г. Санкт-Петербург (Российская Федерация).....	56
3.2 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови трудовых мигрантов из Средней Азии	63
3.3 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей Республики Сербия	65
3.4 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей г. Нур-Султан (Республика Казахстан)	67

3.5 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей Гвинеической Республики (Западная Африка)	72
ГЛАВА 4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МАРКЕРОВ ПВИ В ГРУППАХ РИСКА	77
4.1 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у ВИЧ-инфицированных	77
4.2 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у больных онкогематологического профиля	79
4.3 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у больных малярией	85
4.4 Скрининговое лабораторное обследование пациентов из групп риска на маркеры ПВИ	89
4.4.1 Алгоритм скринингового обследования ВИЧ-инфицированных пациентов на маркеры ПВИ	89
4.4.2 Алгоритм скринингового обследования пациентов онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК, на маркеры ПВИ	91
4.4.3 Алгоритм скринингового обследования больных с хронической анемией (паразитарной этиологии) на маркеры ПВИ	93
ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ PVB19	95
5.1 Разработка способа выявления в биологическом материале ДНК парвовируса В19 на основе двухэтапной ПЦР	95
5.2 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови жителей г. Санкт-Петербург и Ленинградской области	101
5.3 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови условно здоровых жителей г. Нур-Султан	103
5.4 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови условно здоровых жителей Республики Сербия	105

5.5 Сравнительный филогенетический анализ исследованных образцов	107
ОБСУЖДЕНИЕ	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЕ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Парвовирусная инфекция (ПВИ) – вирусное заболевание, которое передается воздушно-капельным путем, трансплацентарно, при пересадке органов и тканей, гемотрансфузионно с донорской кровью и препаратами крови [216].

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

Парвовирусная инфекция может иметь тяжелые последствия для пациентов с иммунодефицитными состояниями. К группам риска относятся онкобольные, ВИЧ-инфицированные, больные с врожденными нарушениями иммунной системы (ПИД), больные с хроническими гемолитическими заболеваниями, пациенты в состоянии иммуносупрессии, перенесшие операцию по пересадке органов или костного мозга, а также больные хроническими инфекционными заболеваниями. У таких пациентов парвовирусной инфекцией могут быть спровоцированы тяжелые формы анемии, скоротечный апластический криз, васкулиты, СКВ, артриты, миокардиты, неврологические расстройства, гепатиты, отторжение трансплантатов [18, 66, 64, 114, 151, 168, 175, 183, 188, 232, 236].

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 аборты [49, 160, 221].

Очевидное значение парвовирусная инфекция имеет в трансфузиологии. В связи с тем, что парвовирус В19 не входит в список обязательных к тестированию возбудителей [1] и устойчив к применяемым методам обеззараживания препаратов крови, компоненты крови для трансфузии могут содержать PVB19. В специальной литературе обращается внимание на необходимость тестирования

донорской крови на ПВИ, так как риск заражения возможен при вирусной нагрузке 10^4 копий/мл и выше [6, 14, 15, 147, 153].

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 PVV19, различающихся структурой генома на 2-13%. При этом серологически они идентичны. Наибольшее распространение в мире имеет первый генотип. Второй генотип до середины прошлого века был широко распространен в Европе. Третий генотип преимущественно обнаруживается в образцах из Европы, Африки, Азии и Южной Америки. [116; 47] На территории РФ (в том числе и на территории Северо-Западного округа) выделены и депонированы в Gene Bank последовательности ДНК PVV19 принадлежащие генотипу 1А [7].

Степень разработанности темы исследования

В научной литературе описаны исследования, посвященные выявлению маркеров ПВИ, в основном, на ограниченных территориях [21], или в отдельных социально значимых группах – это доноры крови, организованные коллективы военнослужащих, беременные женщины [16, 17]. Есть отдельные работы, посвященные выявлению ПВИ в группах риска [20, 42, 64, 79, 82, 186, 205, 221].

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 PVV19 на течение и прогноз основного заболевания у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями крови, представлено единичными работами в отечественной научной литературе [22,104, 157, 208, 218].

Аналогичная ситуация сложилась в области молекулярно-генетических исследований. В базе Gene Bank депонированы около 4900 нуклеотидных последовательностей участков генома парвовируса V19. Из них всего 31 –

выделены на территории РФ, и 26 – секвенированы непосредственно российскими учеными [4, 13, 15]. Данных об изолятах, выделенных с территории Республики Казахстан, в международной базе Gene Bank представлено не было.

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 к PVB19, 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. Установлено, что все проанализированные изоляты, выделенные в РФ, в Республике Сербия и в Республике Казахстан относились к генотипу 1 субтипу 1А, с преобладанием геноварианта 1А1 или 1А2 в тех или иных обследованных популяциях.

На основе выявления лабораторных маркеров ПВИ (анти-IgG к PVB19, ДНК PVB19), получены новые знания о распространении ПВИ на отдельных, географически удаленных друг от друга территориях: в РФ и Республике Сербия (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 соотношения 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 ВИЧ-инфицированных пациентов, больных онкологическими заболеваниями кроветворных органов, лиц, страдающих хронической анемией паразитарной этиологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показана относительная гомогенность циркулирующих на территории Евразийского континента изолятов, принадлежащих к одному генотипу 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 значимость.

Выявлена высокая вирусная нагрузка PVB19 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 PVB19 генотипа 1А субгенотипов 1А1 и 1А2, как близкие по нуклеотидному составу (РФ, Республика Сербия), так и кластеризующиеся в отдельную эволюционную ветвь (Республика Казахстан).

Методология и методы исследования

Методологической основой выполнения работы явились разработка научной гипотезы об особенностях распространенности ПВИ среди лиц, проживающих в разных географических регионах, с использованием иммунологических, вирусологических, молекулярно-генетических методов исследования.

В сравнительном аспекте в работе использовались данные разных авторов, опубликованные в научной литературе. Дизайн исследования включал разработку пяти задач. На первом этапе, с учетом данных литературы, были определены основные контингенты обследования среди условно здоровых лиц разных возрастных групп, проживающих в отдельных странах Европы, Азии и Африки. На втором этапе было сделано предположение о том, что ПВИ актуальна для людей, страдающих различными хроническими заболеваниями: лиц, страдающих хроническими анемиями, онкологических больных, ВИЧ-инфицированных пациентов. На третьем этапе было сделано предположение о возможных различиях и особенностях изолятов парвовируса В19, выделенных на разных территориях.

Детальная оценка распространенности маркеров ПВИ во всех группах на последующих этапах работы позволили подтвердить выдвинутую научную гипотезу. Молекулярно-генетический и филогенетический анализ изолятов позволили охарактеризовать различные геноварианты парвовируса В19. Сравнение полученных данных с результатами, опубликованными в научной литературе, показало их новизну и научно-практическую значимость. Все этапы работы были обеспечены применением адекватной статистической обработки данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным 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 выполнения работы (5467 клинико-лабораторных исследований).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на: международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», посвящённой 110-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера. (Санкт-Петербург, 2018 год), XI съезде ВНПОЭМП «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», (Москва, 2017 год), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», (Москва, 2017 год), VII всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», (Санкт-Петербург, 2015 год), XV Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015 год), Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2018 год), XI Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» Санкт-Петербург, 12-13 октября 2020 г.

Личный вклад автора

Планирование, выполнение исследования, анализ и статистическая обработка данных, представленных в работе, осуществлялись лично автором. Автором разработан метод выявления ДНК РVВ19 в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке. Раздел исследования, посвященный изучению влияния инфицирования РVВ19 на течение малярии, выполнен при участии руководителя госпиталя г. Фрия Гвинейской Республики Левковского А.Е. Раздел исследования, посвященный изучению влияния инфицирования РVВ19 на тяжесть течения онкогематологических заболеваний, выполнен при участии специалистов НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой. Исследование маркеров ПВИ среди населения Республики Сербия проводилось совместно с сотрудниками

лаборатории воздушно-капельных инфекций и Института вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак» и Регионального центра по надзору за корью и краснухой в Республике Сербия (г. Белград, Республика Сербия).

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 Gene Bank депонированы 30 нуклеотидных последовательностей ДНК PVB19: MN534950, MN166338, MG779501, MG779500, MG711455, MF481196, MF408298, MF405142, MT543168, MN427876, MN150057, MK929648, MK929647, MK848594, MK761201, MK642628, MN150059, MN150058, MT543169, MT543170, MN814845, MT543163-MT543167, MT554167- MT554170;

5. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре клинической лабораторной диагностики медико-биологического факультета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург).

6. 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».

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликованы 32 печатных работы, в том числе 8 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 глава монографии «Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет» / 2017 г.- С.-Петербург., под ред. А. Ю. Поповой.

Объем и структура 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 источника, в том числе 23 отечественных и 213 зарубежных. Текст содержит 27 таблиц, 23 рисунка.

ГЛАВА 1 МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРВОВИРУСА В19, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Парвовирус В19

1.1.1 Структурно-функциональная организация генома PVB19

Первые сообщения о ранее неизвестных вирусоподобных частицах, обнаруженных в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов, появились в 1975 году в работах Y.E.Cossart et al. [174] и W.K. Paver et al [172, 173]. Были обнаружены специфические антитела к данным частицам. Новый агент был схож с вирусом гепатита В, как морфологически, так и серологически. Электронная микроскопия показала наличие частиц диаметром 23 нм, напоминающих парвовирусы животных. В дальнейшем эти частицы были отнесены к парвовирусу человека. «Парвовирус» - слово, производное от латинского слова «parvus», что означает «маленький». Свое название парвовирус В19 получил по образцу крови (№19 набора В), из которого он был впервые выделен [174].

Впервые В19 был ассоциирован с заболеванием в 1981 году, когда его связали с апластическим кризисом у пациента с серповидноклеточной анемией. Несколько позже была экспериментально подтверждена связь с инфекционной эритемой [34].

С 2014 года парвовирус В19 (PVB19), согласно новой номенклатуре вирусов ICTV (Международный комитет по таксономии вирусов), отнесен к семейству *Parvovirinae* роду *Erythroparvovirus* вид *Primate erythroparvovirus 1* [219]. В пересмотренной таксономии парвовирусы классифицируются на основе филогенетического анализа аминокислотной последовательности большого неструктурного белка NS1 [106].

Парвовирус В19 представляет собой небольшой вирус без внешней оболочки имеющий икосаэдрический капсид, состоящий из двух типов белковых

субъединиц (рисунок 1). Диаметр вирионов составляет 23—26 нм. Молекулярная масса зрелой вирусной частицы составляет 5,6 МДа.

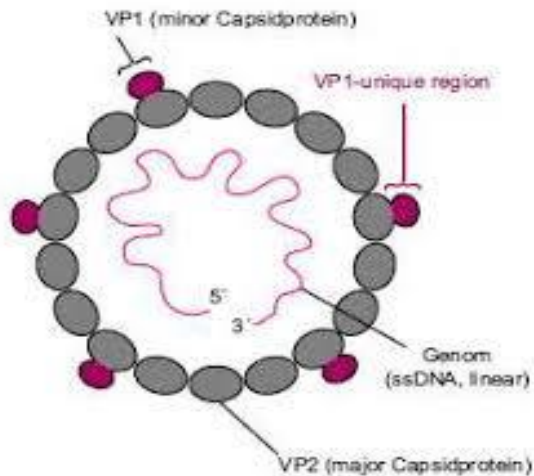


Рисунок 1 - Строение парвовируса B19 [по 228]

Геном парвовируса B19 представлен небольшой линейной одноцепочечной ДНК (ssDNA) длиной 5596 нуклеотидов, фланкированной двумя идентичным концевыми шпильками. Геном состоит из кодирующей области длиной 4830 нуклеотидов, окружённой инвертированными концевыми повторами длиной 383 и 365 нуклеотида, образуя несовершенный палиндром. Эти структуры выполняют функцию сайтов инициации репликации. Геном кодирует один большой неструктурный белок NS1 (~70–80 кДа) с открытой рамкой считывания слева и два структурных белка VP1 (84 кДа) и VP2 (58 кДа) с другой рамкой считывания в правой части [200]. Кроме того, геном PVB19 содержит гены, которые кодируют небольшие неструктурные белки 7,5 кДа и 9 кДа в середине генома и белок 11 кДа на правом конце генома (рисунок 2).

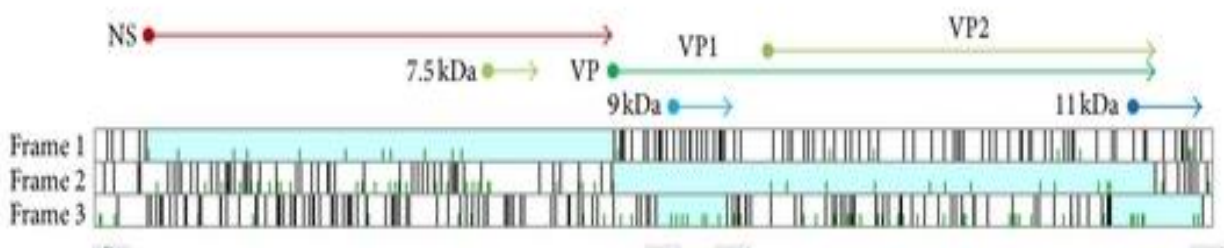


Рисунок 2 - Схема структуры и организации генома парвовируса B19 [по 83]

Геном содержит только один функциональный промотор Р6, расположенный в 3'-палиндроме. Промотор Р6 регулирует синтез 12-и РНК-транскриптов мРНК [63].

Структурные белки VP1/2 являются белками капсида. Минорный белок VP1 состоит из 781 аминокислотного остатка. Белок VP2 содержит 554 аминокислотных остатка и является частью VP1 (отсутствует N-терминальный фрагмент). Данный N-терминальный фрагмент VP1 белка из 227 аминокислот является уникальной областью (VP1u) и обладает фосфолипазной А2-подобной активностью, необходимой в процессе инфицирования. РVВ19 VP1u представляет собой доминирующую антигенную мишень для нейтрализующих антител. Предполагается, что VP1u всегда находится за пределами вириона РVВ19. Во время или после проникновения в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза парвовирусные частицы претерпевают структурные модификации, которые приводят к обнажению N-концов VP белков и высвобождению генома. Белок VP2 способен самостоятельно собираться и образовывать вирусоподобные частицы: пустой вирусный капсид морфологически и иммунологически сходен с инфекционными вирионами.

Капсид парвовируса содержит 60 копий капсидных (VP) белков, которые объединяются в частицу, имеющую икосаэдрическую симметрию $T = 1$ с 3 белками на каждой стороне капсида. В вирусном капсиде соотношение белков VP1/VP2 составляет приблизительно 1/20 (рисунок 3) [230].

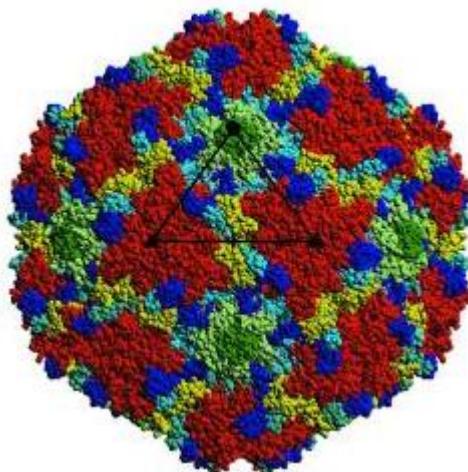


Рисунок 3 - Модель структуры поверхности РVВ19 [по 118]

Неструктурные белки парвовируса выполняют множество различных функций, начиная от регуляции промотора, участия в репликации ДНК, заканчивая индукцией апоптоза.

Неструктурный белок NS1 участвует в репликации ДНК. NS1 является многодоменным ядерным фосфопротеином. Он обуславливает высококонсервативные ферментативные активности и функционирует как хеликаза и как сайт-специфическая ДНК-связывающая эндонуклеаза при упаковывании новой цепочки ДНК. Белок NS1 обладает способностью непосредственно влиять на промотор P6 парвовируса В19, повышая активность экспрессии вирусных генов. Также возможно опосредованное воздействие белка за счет взаимодействия с клеточными факторами транскрипции, связанными с промотором. [145]. Кроме того, было показано, что помимо воздействия на промотор P6 NS1 может модулировать экспрессию некоторых клеточных генов хозяина, активируя фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), продукцию интерлейкина-6 (IL-6) и p21 (внутриклеточный белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A). Так, например, индукция IL-6 белком NS1 подтверждает связь между парвовирусной инфекцией В19 и поликлональной активацией В-клеток при ревматоидном артрите. [24]. Для репликации вирусной ДНК в делящихся клетках используется механизм репликации ДНК хозяина. Имеются литературные данные о том, что белок NS1 индуцирует апоптоз [102, 196] и является ключевым фактором в нарушении клеточного цикла клетки-хозяина, останавливая его в фазе G1, во время которой доступны факторы репликации ДНК хозяина. [96, 103, 105]. Все это указывает на значительную роль белка NS1 в запуске реакции повреждения ДНК клетки-хозяина.

Участок ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность белка NS1, является наиболее консервативным и используется для филогенетического анализа.

Исследования Zhi N. с коллегами небольшого белка 11 кДа показали, что его экспрессия необходима для продуцирования белка капсида VP2 и транспортировки собранных вирусных частиц из ядра в цитоплазму [137]. Также

известно, что этот вспомогательный белок является мощным индуктором апоптоза в клетках-предшественниках эритроцитов, более значимым, чем NS1 [222]. Он необходим для оптимальной репликации вирусной ДНК и высвобождения вириона [199]. PVB19 11 кДа является основным функциональным белком для разрушения предшественников эритроцитов во время инфекции PVB19 [222].

Функция неструктурных белков 7,5 кДа и 9 кДа остается неопределенной.

PVB19 имеет выраженную тропность к эритроидным клеткам. Репликация PVB19 происходит преимущественно в эритроидных клетках-предшественниках костного мозга. Его продуктивная репликация ограничена коротким периодом времени после дифференциации КОЕ-Э (CFU-E унипотентной гемопоэтической клетки костного мозга человека) с кластером дифференциации CD34+ в эритроидные предшественники – EPC, эндотелиальные прогениторные клетки (endothelial progenitor cells) CD36+ [191]. Дифференцированные CD36+ эритроидные клетки-предшественники являются перmissive для экспрессии генов PVB19, репликации и продукции вирусных частиц [71]. Но не все эритропоэтические клетки одинаково перmissive для репликации вируса. PVB19 также может продуктивно реплицироваться, хотя и гораздо менее эффективно, в линии мегакариобластоидных клеток человека. Жизнеспособность продуктивных типов клеток зависит от доступа к эритропоэтину (Epo), необходимому для поддержания дифференцировки и пролиферации эритроидных предшественников и эритробластов [201], и передача сигналов Epo / Epo-рецептор (Epo-R) играет ключевую роль в развитии инфекции PVB19 [170].

Основным рецептором PVB19 является P-антиген (гликосфинголипидглобозид). PVB19 инфицирует EPC путем связывания с P-антигеном - первичным рецептором PVB19. В то же время P-антиген необходим, но недостаточен для проникновения PVB19 в клетку. Было показано, что $\alpha 5\beta 1$ интегрин и ДНК-связывающий белок KU80 являются корецепторами, которые облегчают интернализацию вируса. [125, 233]. Выраженное сродство PVB19 к клеткам эритроидной линии зависит не только от экспрессии вирусных

рецепторов и корецепторов на поверхности клетки, но также от внутриклеточных факторов хозяина, которые поддерживают репликацию PVB19. Исследования Ganaie S.S. et al показывают, что PVB19 использует белок 38 (RBM38) для процессинга пре-мРНК во время репликации вируса. Это способствует экспрессии белка 11 кДа и опосредованному этим белком увеличению репликации PVB19 [199].

Было установлено, что, несмотря на выраженную тропность к клеткам эритроидного ряда, неэритроидные типы клеток, несущие Р-антиген, также могут быть инфицированы PVB19. Однако неэритроидные клетки являются непермиссивными или полупермиссивными из-за особенностей транскрипции, сплайсинга и трансляционных функций, которые нарушают репликацию и продукцию вируса [177]. Исключением является только эндотелий плаценты, где поддерживается размножение PVB19 (180).

PVB19 инфицирует различные неэритроидные типы тканей и клеток: печеночную ткань [100, 151], синовиальную [136], ткани миндалин [73] и эндотелиальных клеток миокарда [36]. В этих случаях наблюдается повышенная экспрессия генов, связанная с воспалением. В то время как продуктивная инфекция PVB19 вызывает гибель эритроидных клеток, непродуктивная инфекция неэритроидных тканей вызывает воспалительные реакции, которые приводят к различным патологиям [180].

Вирус PVB19 может использовать альтернативный путь проникновения в клетку путем комплексообразования с антителами. В работах von Kietzell было продемонстрировано антитело-зависимое усиление поглощения PVB19 (в 4000 раз) в эндотелиальных клетках в присутствии PVB19-специфических человеческих антител. При этом включается альтернативный механизм, опосредованный термочувствительным фактором комплемента C1q и его рецептором CD93 [36].

Цикл репродукции парвовируса B19 схематично представлен на рисунке 4 [191]. При инфицировании клеток-предшественников эритроцитов PVB19 первоначально взаимодействует с Р-антигеном на поверхности клетки. Это

взаимодействие вызывает конформационное изменение белка VP1 и N-концы VP1 транслоцируются на поверхность частицы, обнажая домены фосфолипазы, которые необходимы для проникновения частиц в липидный бислой.

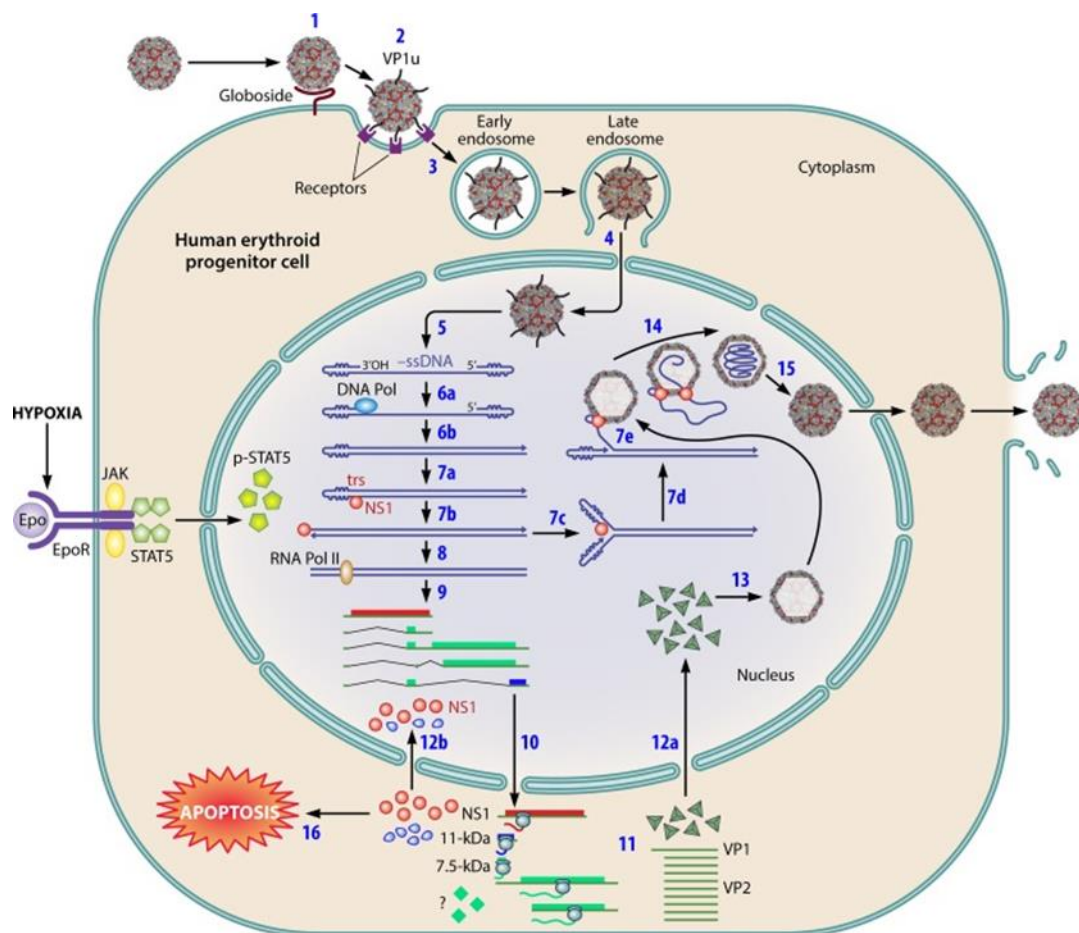


Рисунок 4 - Цикл репродукции парвовируса B19 [по 191]

Далее область VP1u на вирионе связывается с рецептором клеточной поверхности (белком, взаимодействующим с VP1u), который обеспечивает интернализацию вириона внутрь клетки, предположительно, посредством эндоцитоза. Пройдя несколько этапов внутриклеточного переноса в эндосоме, вирионы в конечном итоге высвобождаются из нее и попадают в ядро. В ядре происходит высвобождение генома вируса (+ssDNA или -ssDNA). Процесс репликации требует клеточной ДНК-полимеразы (DNA Pol) и других факторов репликации ДНК клетки-хозяина: эритропоэтина (Epo), STAT5 белок (signal transducers and activators of transcription - фактора транскрипции эукариот,

участвующего в передаче сигнала от цитокинов и факторов роста), тирозинкиназы (Jak) [105]. Фосфорилированный STAT5 активируется по пути Еро / Еро-R / Jak2 / STAT5 в условиях гипоксии.

Парвовирусы реплицируют ssDNA используя однонаправленную стратегию смещения нитей, называемую репликацией «вращающейся шпильки», которая является эволюционной адаптацией синтеза катящегося кольца (Rolling circle replication). Эта адаптация опосредована шпильчными структурами. Такие концевые последовательности служат праймерами репликации для клеточной ДНК-полимеразы, они функционально плеiotропны, приводят к возникновению дуплексной репликации и действуют как шарниры, которые попеременно складываются и разворачиваются. При этом амплификация линейной ДНК развивается по круговой модели [127] (рисунок 5).

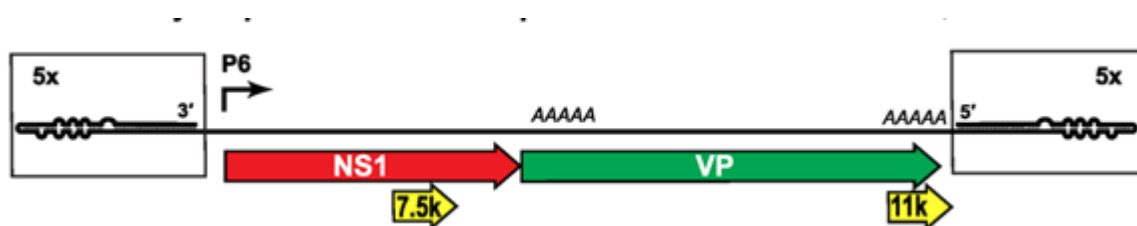


Рисунок 5 - Шпильчные структуры в геноме PVB19 [по 127]

Транскрипция ДНК PVB19 с образованием вирусной пре-мРНК происходит с участием клеточной РНК-полимеразы II (РНК Pol II). Далее в результате альтернативного процессинга пре-мРНК PVB19 подвергается альтернативному сплайсингу и полиаденилированию. Образовавшиеся мРНК PVB19 экспортируются в цитоплазму. В цитоплазме происходит трансляция капсидных белков VP1/2 и неструктурных белков NS1, 11 кДа, 9 кДа и 7,5 кДа. VP1 и VP2 собираются в виде предшественников капсидов, с последующей транспортировкой в ядро для сборки пустых капсидов. Белок NS1, необходимый для репликации вирусной ДНК и остановки клеточного цикла, транспортируется в ядро. Когда доступен пустой капсид, вирусная ДНК упаковывается в капсид через предполагаемый NS1-опосредованный механизм упаковки. На последнем

этапе индуцируется апоптоз, на котором белок NS1 и белок 11 кДа играют важную роль. В процессе апоптоза зрелые вирионы высвобождаются из инфицированных клеток через разрушенную ядерную мембрану.

Вместе с тем, имеются сообщения о том, что PVB19-инфекция клеток-предшественников эритроцитов нарушает геном человека и способствует интеграции вирусной ДНК в ДНК хозяина. Было обнаружено более 4×10^4 уникальных событий интеграции PVB19 после инфицирования клеток-предшественников эритроцитов CD36+. Интеграция происходит по всему геному и, вероятно, зависит от эндонуклеазной активности NS1. Экспрессия NS1 может привести к надрезанию хромосомной ДНК хозяина, что дает возможность для интеграции ДНК PVB19 в геном хозяина. [164]. Непродуктивная инфекция PVB19 может быть функционально схожа с инфекциями адено-ассоциированного вируса (AAV) при отсутствии вируса-помощника. При непродуктивных инфекциях AAV низкие уровни экспрессии белков репликации Rep (хеликаз) достаточны для обеспечения стабильной интеграции AAV в геном хозяина, но не репликации ДНК вируса [226]. Предполагается, что PVB19-инфекция непродуктивных клеточных линий приводит к низким или умеренным уровням экспрессии NS1, при которых возможна интеграция ДНК PVB19. Одним из возможных механизмов реактивации может быть суперинфекция вирусом-помощником. Исследования показали, что аденовирусная инфекция может обеспечивать некоторую вспомогательную функцию для трансфицированной ДНК PVB19, а репликация ДНК PVB19 в непермиссивных клетках может поддерживаться присутствием либо аденовируса, либо некоторых его генных продуктов. Это подтверждает возможность коинфекции PVB19 и других вирусов, таких как аденовирус, HHV6, EBV в тканях дыхательных путей [220].

1.1.2 Географическое распределение генотипов PVB19

На основе сравнения нуклеотидных последовательностей PVB19 подразделяется на три отдельных генотипа: 1, 2 и 3. Генотип 1 состоит из

изолятов прототипа PVB19 (прототип штамма Au - регистрационный номер Gene Bank M13178), генотип 2 включает A6 (прототип A6 - регистрационный номер Gene Bank AY064475) и Lali (прототип Lali - регистрационный номер Gene Bank AY044266) и родственные им изоляты. Генотип 3 включает изоляты V9 (прототип V9 - регистрационный номер Gene Bank AX003421) и D91.1 (прототип D91.1 - регистрационный номер Gene Bank AY083234) и связанные с ним изоляты [86]. Генотипы 1 и 3 представлены двумя подтипами: 1А и 1В, 3А и 3В. Внутри гена NS1 расхождение последовательностей между генотипами 1, 2 и 3 составляет около 2-13% на уровне нуклеотидов, расхождение между подтипами - около 5%. [116] (рисунок 6). Среди штаммов PVB19 подтипа 1А было обнаружено четкое разделение на две группы, отличающиеся синонимичными мутациями, распределенными по всему геному, и было предложено разделять подтип 1А на две группы 1А1 и 1А2. Наиболее заметное различие ДНК, составляющее более 20%, наблюдается в области промотора P6.

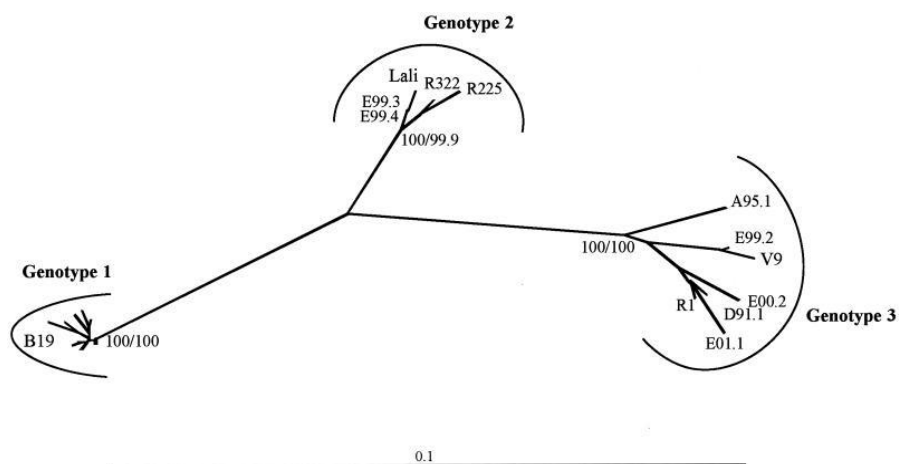


Рисунок 6 - Филогенетические отношения между вирусом B19 и V9-родственными вирусами на основе последовательностей NS1-VP1u (994 п.н.) [по 86]

По данным из литературных источников [116] и проведенному анализу распространенности генотипов PVB19, прослеживается географическое ограничение распределения генотипов в мире, а наибольшее распространение имеет генотип 1. Его распространенность в мире составляет 61,6 – 95,7%% в

зависимости от географического региона. Генотип 2 регистрируется в 0,4-36,7%%, генотип 3 – 1,6-22,1%%.

Так, обнаружение генотипа 1 в Европе составляет до 62,0% (Германия, Италия, Франция, Польша, Великобритания, Финляндия, Болгарии, Республика Беларусь) [9]. В европейской части России все выделенные образцы относились к генотипу 1. [12]. В странах Африки (ЮАР, Гана, Габон и Нигерия) 66,4% генотипированных вариантов принадлежат к генотипу 1. До 96% образцов из Азии (Вьетнам, Индии, Ирана, Китая, Корея, Таиланд, Япония) и 88% из Южной Америки (Бразилия, Парагвай) также относят к генотипу 1 [138]. В Северной Америке (США) большинство обнаруженных в исследованиях штаммов генотипированы также как генотип 1 [86, 141].

Генотип 2 обнаруживается в Европе (Германия, Италия Франция, Польша) в 36,7% генотипированных изолятах, в основном, из биопсийных тканей людей, родившихся до 1960 года. Сообщается о двух случаях высокой виремии у иммунокомпрометированных пациентов в Польше, обусловленной RVB19 генотипа 2 [107], хотя предполагалось ранее, что генотип 2 был замещен генотипом 1, и прекратил циркуляцию в Европе в период до 1970 года [192]. В Африке генотип 2 был обнаружен в ЮАР, Нигерии и Габоне, всего в 11,5 % случаях. Распространённость генотипа 2 в Азии составляет до 1,4%, в Южной Америке сообщается о единичных образцах (0,35%) этого генотипа (Бразилия) [148]. Спорадически обнаруживается в Северной Америке (США).

Генотип 3 наиболее часто встречается в странах Африки (22,1%) - ЮАР, Гана, Нигерия. В Южной Америке (Бразилия) обнаруживается около 12%, в Северной Америке (США) встречается редко. В Европе в целом - 1,6%, в то время как в Германии, Италии, Болгарии отмечаются единичные случаи обнаружения генотипа 3, во Франции до 11,4 % анализируемых изолятов соответствовали генотипу 3 [86]. В Азии (Индия) распространённость генотипа 3 составляет в общем 2,9%. В Китае до 17,8% образцов принадлежали генотипу 3 [70].

Нет единого мнения об эволюции вируса и частоте мутаций, характеризующейся показателями скорости замещения нуклеотидных

последовательностей. L.A. Shackelton и E.C. Holmes в 2006 году, проанализировав частоты замещения нуклеотидов в геноме PVB19 в современных образцах (38 последовательностей), сообщили о высокой скорости эволюционных изменений, около 10^{-4} нуклеотидных замен на сайт в год, более характерной для РНК-содержащих вирусов. [210]. В 2008 году группой европейских ученых также было сообщено о стабильно высокой (4×10^{-4}) скорости замещения в геноме PVB19 в образцах, выделенных из плазмы крови, но в образцах из биопсийных тканей скорость замещения была в десятки раз ниже. Исходя из полученных данных, ученые предположили, что последний общий предок для циркулирующих в настоящее время вариантов генотипа 1 парвовируса В19 существовал примерно в 1960-х годах. С этими данными хорошо согласуется факт прекращения циркуляции на территории Европы генотипа 2 [192].

Однако, в исследованиях Shen H. et al., проводивших филогенетический и рекомбинационный анализ PVB19 на основе генов NS1 и VP доступных в Gene Bank, было показано, что генотип 2 является результатом рекомбинации между генотипами 3 и 1 [109].

Mühlemann B et al. в 2018 году на основании филогенетического анализа образцов зубных и скелетных останков людей, живших в Евразии и Гренландии от 0,5 до 6,9 тысяч лет назад утверждают, что самый последний общий предок всех PVB19 мог существовать 12,6 тысяч лет назад. По их мнению, скорость замещения нуклеотидных последовательностей в геноме на порядок ниже ($1,22 \times 10^{-5}$), чем сообщалось ранее, и соответствует скорости замещения для других одно- и двухцепочечных ДНК-вирусов. Так же было показано, что предположительно 5,0-6,8 тыс. лет назад в результате рекомбинации между генотипами 1 и 3 был образован генотип 2. Последние общие предки генотипов 1, 2 и 3 существовали, по расчетам авторов, 7,1; 1,9 и 2,5 тыс. лет назад соответственно. Древние последовательности генотипа 1 были найдены в Средней Азии, генотипа 2 - в Европе и Гренландии [32].

Вирусы всех трех генотипов принадлежат к одному серотипу. Это подтверждает 100% перекрестная реактивность антител к штаммам каждого из

трех генотипов [47]. Все три генотипа выявлялись как у лиц с симптомами парвовирусной инфекции, так и у лиц с бессимптомным течением. Связь генотипов с клиническими проявлениями не установлена. Вместе с тем, чаще сообщается о более высокой вирусной нагрузке при инфицировании PVB19 генотипа 1 [116].

В нескольких исследованиях было высказано предположение, что после первичной инфекции ДНК парвовируса В19 обнаруживается в тканях переболевших людей независимо от иммунологического статуса (иммунокомпетентный или иммунокомпрометированный пациент) и формы проявления ПВИ (бессимптомно или с различной симптоматикой). Устойчивость генома PVB19 в тканях человека является повсеместной и пожизненной и представляет собой объект, называемый биопортфолио [192, 178].

1.2 Распространение и патогенез парвовирусной инфекции

ПВИ широко распространена во всем мире. Серологическим свидетельством перенесенной инфекции является наличие PVB19 вирусспецифических IgG - антител в крови. После перенесенной ПВИ сохраняется пожизненный иммунитет. Заражение PVB19, как правило, происходит в детском и подростковом возрасте от 5 до 15 лет. Однако в эпидемический процесс вовлечены и взрослые, не имеющие иммунитета к ПВИ. Распространенность PVB19-специфических IgG-антител в популяции зависит от возраста: от 2 до 20% у детей в возрасте до 5 лет, от 15 до 40% у детей в возрасте от 5 до 18 лет и от 40 до 80% у взрослого населения [11, 161, 191]. Региональные различия проявляются на относительно близких территориях, таких, например, как г. Москва и Республика Беларусь. Так, при оценке состояния специфического иммунитета разных возрастных групп населения г. Москва в 2015 году, было показано, что доля серопозитивных результатов увеличивалась с 25% у детей 1-2 лет до 56,3% в возрастной группе 30 лет и старше [21]. В то время как у жителей республики Беларусь показана низкая серопревалентность в детских возрастных

группах (0-2 года – 8,8%, 3-4 года – 11,8%) и более высокий уровень серопозитивных лиц в группе 40-44 года (85,4%) [8].

Однако возраст заражения парвовирусной инфекцией В19 может быть выше в странах с тропическим климатом (с обусловленным климатом определенными социальными условиями). В исследованиях распространенности ПВИ в Сингапуре общий уровень серопревалентности составил 16,2%. Все дети в возрасте до 5 лет были серонегативными. Распространенность антител постепенно увеличивалась с 3,5% у детей 5–14 лет до 28% в возрастной группе 25-34 года, а в возрастной группе старше 35 лет 65% имели антитела к парвовирусу В19. Это также соответствовало очень низкой заболеваемости ПВИ в течение двух десятилетий в Сингапуре [131]. Индийские исследователи сообщают о средней серопревалентности среди населения на уровне 19% с максимальными значениями 44% у взрослых 20-60 лет. [204]. Более поздний возраст заражения может быть связан с тем, что в странах Юго-Восточной Азии существенно ниже доля детей, посещающих дошкольные учреждения, чем в европейских странах.

Для ПВИ характерны сезонные колебания с подъемом заболеваемости в зимне-весенний период. Цикличность эпидемических вспышек составляет 3-4 года [67]. Во время вспышек распространение вируса среди серонегативных лиц происходит, как правило, в организованных коллективах. Имеются многочисленные сообщения о вспышках ПВИ в группах детских дошкольных учреждений, в школах, в лечебных учреждениях, особенно в детских гематоонкологических отделениях [4, 50, 101, 138, 150].

Передача инфекции РVВ19 происходит воздушно-капельным путем, при переливании крови или ее компонентов, при пересадке органов и тканей, а также трансплацентарно от матери к плоду. Воздушно-капельный путь от людей с острой инфекцией является наиболее распространенным способом передачи РVВ19. Периодом высокого риска для распространения является ранняя стадия острой инфекции, до появления сыпи или артралгии. У людей с острой инфекцией вследствие массивной продуктивной репликации парвовируса В19 вирусная нагрузка бывает очень высокой (до 10^{13} копий ДНК /мл) и РVВ19 может быть

обнаружен в дыхательных секретах и других жидкостях организма. Виремия PVB19 возникает через одну неделю после заражения и обычно длится около 5 дней с пиками вирусных титров в первые 2 дня (рисунок 6). Затем происходит быстрое снижение до низкого уровня, который может сохраняться в течение многих месяцев или даже лет. Выздоровливающий пациент, даже с повторяющимися приступами сыпи, больше не заразен. В то время как пациенты с гемолитическими расстройствами, вызванными PVB19, во время заболевания чрезвычайно заразны [34, 119].

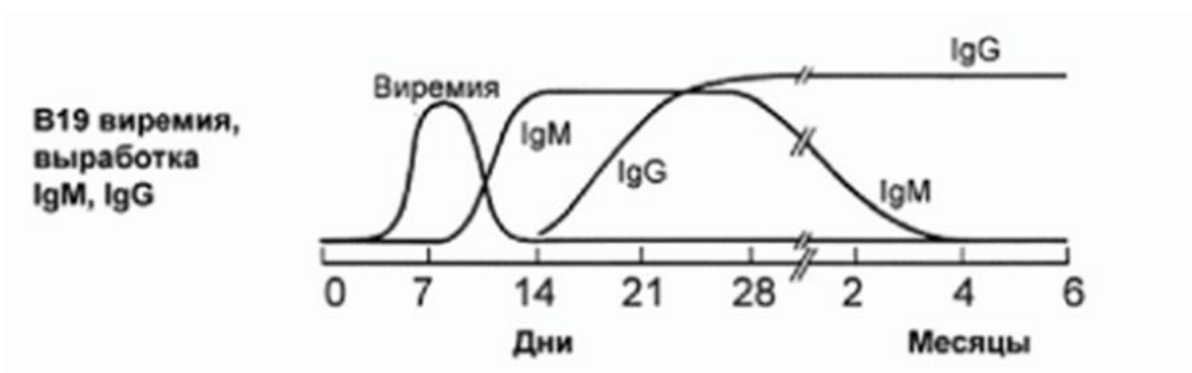


Рисунок 6 - Развитие вирусемии и иммунного ответа при ПВИ [по 89 с изменениями]

В настоящее время неизвестно, как PVB19 преодолевает эпителиальный барьер дыхательных путей, чтобы в конечном итоге достичь костного мозга [191]. Сообщается о локальной репликации вируса в горле [120]. Было показано, что В-лимфоциты в тканях миндалин содержат вирусный В19 геном на протяжении длительного времени и инфицирование может происходить с участием антителозависимых механизмов [73].

При парентеральной передаче инфекции путем переливания зараженной крови или ее компонентов, при трансплантации тканей и органов или трансплацентарно от матери к плоду, вирус непосредственно попадает в кровоток.

В ответ на инфекцию PVB19 развивается иммунный ответ (рисунок 7). Традиционно считается, что гуморальный иммунный ответ наиболее важен для устранения и долгосрочной защиты от повторного заражения ПВИ.

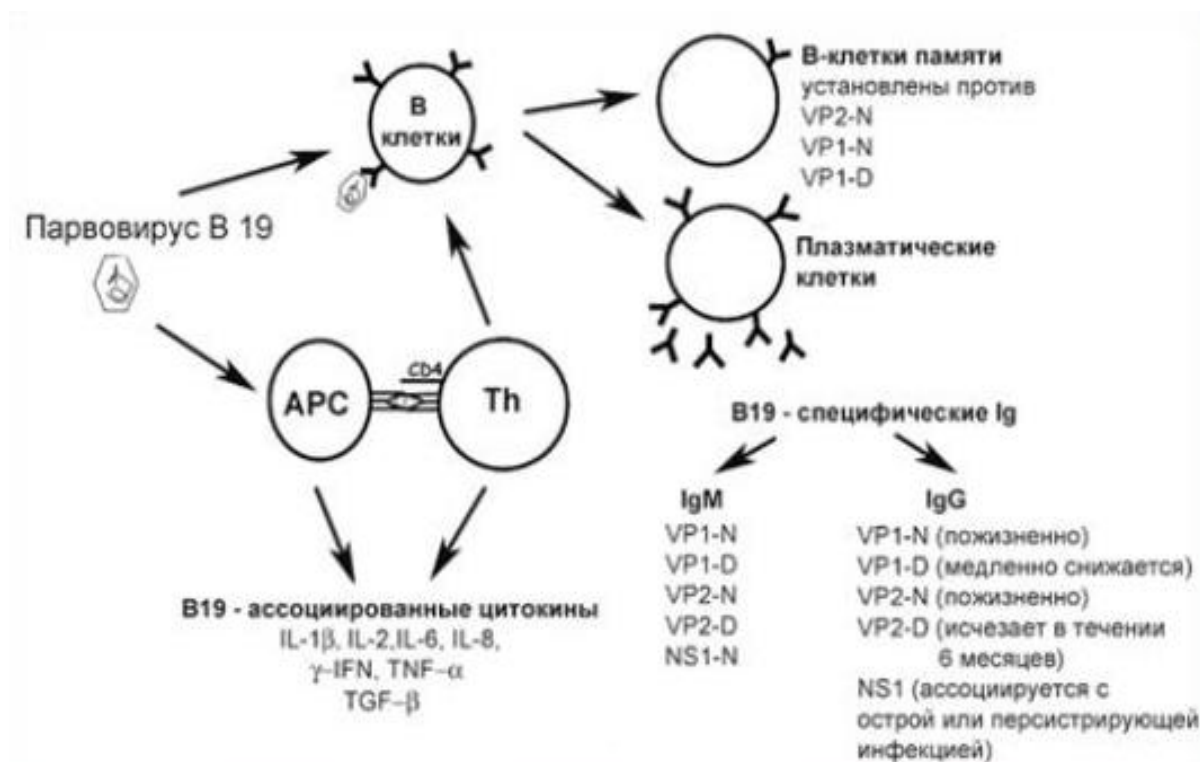


Рисунок 7 - Схематическое изображение Т- и В-клеточного ответа на парвовирусную инфекцию В19 [по 57 с изменениями]

Предполагается, что инфекция в первую очередь контролируется гуморальными иммунными реакциями, поскольку периферическая вирусемия уменьшается одновременно с развитием вирус-специфических антител [211]. Антитела IgM против PVB19 начинают обнаруживаться на поздней стадии вирусемии. IgM антитела в сыворотке крови пациента выявляются одновременно с появлением симптомов заболевания. Они обнаруживаются через 8-14 дней после заражения и могут сохраняться от 3 до 6 месяцев, а в некоторых случаях и дольше (рисунок 6). Специфические антитела IgG выявляются через 12-15 дней после заражения, их концентрация остается высокой несколько месяцев, после чего снижается. Антитела IgG, как правило, сохраняются в течение длительного времени.

PVB19 антитела IgA обнаруживаются в течение короткого периода времени и могут играть защитную роль в дыхательных путях. Кроме того, были обнаружены долговременные специфичные к PVB19 антитела IgE у пациента с

аллергическими симптомами во время острой инфекции, но их биологические функции неясны [95].

Продуцирование антител направлено против конформационных и линейных эпитопов обоих типов вирусных капсидных белков VP1 и VP2, а также неструктурного белка NS1. Было обнаружено, что большая часть эпитопов VP1 локализована в области VP1u и VP1-VP2. Против этих эпитопов формируется более сильный иммунный ответ по сравнению с эпитопами, локализованными в области VP2 [144]. Эпитопы в области VP1u в основном линейные. Несмотря на низкую долю в вирионе PVB19, VP1u представляет собой доминантную антигенную мишень для нейтрализующих антител [85].

Обнаружение антител к тем или иным эпитопам зависело от времени и течения инфекции. Так, иммунный ответ IgM против конформационных эпитопов VP1 в активной фазе ПВИ оказался доминантным и длительным [62]. Специфические IgM антитела, направленные в основном против VP2-специфических эпитопов, присутствовали в крови от двух до десяти недель после острой инфекции. Антитела IgG, обнаруженные у серопозитивных доноров, распознавали в большей степени конформационные эпитопы, расположенные в области вдоль большей части белка VP2 и в N-концевой области VP1u [108]. Антитела IgG против линейных эпитопов VP2 внезапно исчезали в течение 6 месяцев, однако конформационные антитела к VP2 сохранялись [26, 69]. Предполагается, что анти-NS1 IgG связан с персистирующей и осложненной инфекциями [35], тогда как анти-NS1 IgM могут появляться при острых инфекциях.

Парвовирусная инфекция вызывает иммунный ответ, который обеспечивает пожизненную защиту от повторных инфекций. Было показано, что PVB19-специфическая В-клеточная память поддерживается против конформационных эпитопов VP2 и линейных эпитопов VP1, но не поддерживается против линейных эпитопов VP2 [58].

Однако литературные данные свидетельствуют о том, что гуморального иммунитета может быть недостаточно для уничтожения вируса [65]. Клеточный

иммунный ответ также играет важную роль в борьбе с вирусной В19 инфекцией. При ПВИ были описаны как CD4⁺ пролиферативные, так и CD8⁺ цитотоксические Т-клеточные ответы [215]. PVB19-специфичный Т-клеточный ответ направлен как против белков VP1 и VP2 [132], так и на NS1 пептид [81]. Цитотоксическое действие CD8⁺ Т-клеток наблюдалось у пациентов с острой ПВИ. Активированные CD8⁺ Т-клетки против эпитопов В19 сохранялись в течение месяцев после исчезновения виремии. В исследованиях они обнаруживались в период до двух лет после заражения. У пациентов с хронической инфекцией клеточный иммунный ответ нацелен на VP1 и VP2 белки. Капсиды, содержащие VP1/2 протеин или только VP2 белки, стимулируют Т-хелперные клетки к высвобождению гамма-интерферона (IFN- γ) и IL-10, что позволяет предположить, что VP2 является основной мишенью для PVB19-специфических Т-хелперных клеток [81]. VP1u-специфический ответ IFN- γ преобладал у недавно инфицированных пациентов, в то время как у давно инфицированных пациентов VP1u-специфический ответ IFN- γ и IL-10 не обнаруживался. Изучение спектра цитокинов в ответ на инфекцию PVB19 показало, что они относятся к типу Th1, причем IL-2, IL-12 и IL-15 выявлялись у пациентов с острой инфекцией, что соотносилось с устойчивым ответом CD8⁺ Т-клеток [59].

По мнению ряда авторов, ПВИ связана с развитием различных аутоиммунных заболеваний: течение инфекции сопровождается выработкой различных аутоантител, которые являются пусковым механизмом для развития аутоиммунных патологических процессов, включая ревматологические, неврологические, нервно-мышечные, сердечно-сосудистые, гематологические, нефрологические и метаболические. Механизмы аутоиммунитета, опосредованные ПВИ, включают молекулярную мимикрию, апоптоз, индуцированный ПВИ и приводящий к презентации собственных антигенов Т-лимфоцитам, и фосфолипазную активность уникальной области белка VP1 В19 [120].

Так, имеются литературные свидетельства, подтверждающие функциональную значимость аутоантител, обнаруженных у людей с острой и персистирующей ПВИ, в контексте следующих заболеваний: ревматоидный артрит (RF, антитело против циклического цитруллинированного пептида), системная красная волчанка (антитело против кардиолипина), ювенильный идиопатический артрит (анти-кардиолипиновые, антифосфатидилсериновые и анти- β 2-гликопротеиновые I антитела), гломерулонефрит (антиядерное антитело, анти-кардиолипиновое антитело, протеиназа-3 ANCA, анти-GBM антитело, антинейтрофильная миелопероксидаза, цитоплазматическое антитело), аутоиммунная гемолитическая анемия (анти-ЖК антитело, антитело Доната-Ландштейнера - антиген группы P), синдром Эванса (антитело против эритроцитов), сахарный диабет 1 типа (Инсулинома антиген-2 (IA-2) антитело, антитело против GAD), тиреоидит Хашимото (анти-ТПО, антитело против тиреоглобулина) и болезнь Грейвса (антитело против TSH) [120, 142].

ПВИ кроме активации продукции аутоантител может модулировать клеточный иммунный ответ [84]. Например, NS1 пептид посредством активации сигнального пути STAT3/PIAS3 в эндотелиальных клетках человека активирует воспалительный ответ, увеличивая продукцию IFNAR1 (субъединица 1 интерферона альфа и бета-рецептора 1) и IL-2 и подавляет противовирусный ответ OAS1 (2'-5'-олигоденилатсинтетаза 1) и TYK2 (тирозин киназа 2) [63]. Фосфолипазная активность A2 VP1u участвует в выработке воспалительного ответа в синовиоцитах [27]. Активация каспазного пути неструктурным белком NS1 в печени индуцирует апоптоз гепатоцитов [182].

1.3 Клинические проявления и медицинская значимость

PVB19 является облигатным патогенным вирусом человека и причиной многих заболеваний. Инфекция может быть связана с широким спектром патологий и клинических проявлений - от бессимптомных доброкачественных форм, до угрожающих жизни состояний. Тяжесть заболевания зависит от

возраста, иммунологического и гематологического статуса инфицированных людей [211]. Продуктивная репликация PVB19 в костном мозге при острой инфекции ведет к гибели эритробластов, обуславливает виремию, ведущую к системному распространению вируса и может быть причиной поздних клинических проявления. Кроме того, на этой стадии в крови присутствуют как вирус, так и специфические антитела. Поэтому предполагается, что патологические проявления так же могут обуславливаться и иммуноопосредованными воспалительными процессами [134].

Наиболее частой клинической формой инфекции является инфекционная эритема, описанная еще в 18 веке врачом Robert Willan, и в 20 веке классифицированная как «пятая болезнь» среди классических экзантем детского возраста. Это заболевание является наиболее распространенным проявлением инфекции у детей [33]. Инкубационный период инфекционной эритемы составляет в среднем 4–14 суток. Продромальные явления в большинстве случаев отсутствуют или проявляются повышением температуры тела до субфебрильных значений, катаральными явлениями. Сыпь появляется через 5-7 дней на лице, в виде яркой эритемы на щеках, что придает больному вид получившего пощечину (синдром отшлепанных щек), затем распространяется по всему телу в виде кружевной макулопапулезной сыпи с преимущественной локализацией на разгибательной поверхности конечностей. Сыпь бесследно исчезает через 7-10 дней. В крови больных людей обнаруживаются специфические антитела IgM и IgG к PVB19. «Пятая болезнь» характеризуется сезонными вспышками, схожими с краснухой, которые чаще приходится на зимне-весенний период с перерывами в 3-4 года.

Артропатия является более частым проявлением ПВИ у взрослых, особенно у женщин [93]. Около трети взрослых с инфекционной эритемой страдают от острых проявлений инфекционного процесса со стороны суставов [52]. Как правило, эти симптомы кратковременны. Но могут наблюдаться суставные боли длительностью от нескольких недель до нескольких лет [41]. Сообщается, что около 25% образцов синовиальной биопсии, взятой от пациентов с диагнозом

«недифференцированный моно- и олигоартрит», содержали ДНК PVB19 [91]. Предполагается возможная роль ПВИ в патогенезе ювенильного идиопатического артрита [167]. Имеются данные об обнаружении в суставах ДНК PVB19 и иногда капсидного белка, указывающие на возможную репликацию вируса. Пациенты с ослабленным иммунитетом, которые не могут вызвать реакцию антител на PVB19, обычно не развивают суставные симптомы.

Скоротечный апластический криз (ТАС) - первое заболевание, в отношении которого была доказана этиологическая роль PVB19 в связи с его внезапным появлением в семьях, коротким инкубационным периодом и транзиторностью [75]. По разным данным, от 68% до 100% случаев ТАС связывают с инфекцией PVB19. Скоротечный апластический криз, как правило, развивается у больных с хроническими гемолитическими заболеваниями (наследственный сфероцитоз, серповидноклеточная анемия и т.п.). У здоровых людей кратковременное прекращение эритропоэза во время вирусемической фазы не вызывает развития анемии, и уровни гемоглобина снижаются незначительно. Напротив, серьезное и опасное для жизни снижение гемоглобина может происходить у больных с укороченной (от 5 до 15 дней) продолжительностью жизни эритроцитов, как в случае с хроническими гемолитическими нарушениями [139], когда развивается чрезвычайно тяжелая анемия (с уровнем гемоглобина 24-32 г/л) [188], что может сопровождаться инфарктом, некрозом костного мозга [39], секвестрацией селезенки, гемофагоцитозом [229]. Последующее восстановление в течение 1-2 недель связано с появлением антител IgM и IgG, специфичных к PVB19.

Апластический криз при ПВИ был описан в случаях наследственного соматоцитоза, талассемии, дефицита эритроцитарных ферментов, железодефицитной анемии, приобретенных иммунных гемолитических анемий, синдрома иммунодефицита человека, миелофиброза и острого и хронического лимфоцитарного лейкоза.

Сообщается о разнообразных заболеваниях крови и цитопений, затронувших несколько линий крови, зафиксированных во время или после ПВИ. К ним относятся цитопения, поражающая эритроидные,

мегакариобластоидные, миелоидные и лимфоидные линии, а также различные бицитопении, панцитопения [121, 236], синдром некроза костного мозга/жировой эмболии [48], миелодиспластический синдром, лейкоэритробластопения и лимфофагоцитарный лимфоцитоз. Инфекция В19 может осложнять течение острого лейкоза или предшествовать ему. РВВ19 может вызвать литическую инфекцию, приводящую к тяжелой анемии, к истинной эритроцитарной аплазии (парциальной красноклеточной аплазии) [51, 135]. Изредка могут встречаться инфекции РВВ19 незритроидных клеток крови с участием тромбоцитов. В этих случаях ПВИ может вызывать тромбоцитопению с анемией [121], имеется также единичный эпизод описанной приобретенной мегакариоцитарной тромбоцитопенической пурпуры [99]. Описываются случаи иммунной тромбоцитопенической пурпуры, пурпуры Геноха-Шонлейна, связанных с ПВИ [119], а также такие редкие заболевания, как активация макрофагов при синдроме гемофагоцитоза [121].

Кроме того, инфицирование лейкоцитарных клеток РВВ19 может вызывать лейкопению и агранулоцитоз [31], недостаточность костного мозга [209]. РВВ19 может играть двойную роль, с одной стороны – в качестве этиологического фактора лейкемии, а с другой стороны, обладая естественными онколитическими свойствами, разрушать клетки крови [189]. При лейкемии, особенно у детей с острым лимфобластным лейкозом, инфекция РВВ19 может предварять или ускорять лейкоз, а также может осложнять течение лейкоза, вызывая постоянную анемию и требуя длительной индукционной терапии [38, 158, 175].

За последнее десятилетие РВВ19 часто связывают с патогенезом миокардита и его прогрессированием. Чаще всего ПВИ выявляется по серологическим признакам недавней инфекции, реже – по обнаружению вирусных геномов в сердечной ткани. Многочисленные сообщения указывают на то, что РВВ19 является новым кардиотропным вирусом, который может вызывать острый воспалительный миокардит, приводящий к дилатационной кардиомиопатии [168] и изолированной диастолической дисфункции желудочка

[90]. Острые миокардиты с крайне неблагоприятным прогнозом описаны как осложнение ПВИ у детей и взрослых [23, 76], что подтверждалось высокой PVB19 вирусной нагрузкой. Сообщалось, что PVB19 инфицирует внутрисердечные эндотелиальные клетки артериол или венул, что может нарушать микроциркуляцию в клетках миокарда, а также вследствие проникновения воспалительных клеток в миокарде, может вызывать дисфункцию желудочков и вторичный некроз миоцитов [94]. Инфекция PVB19 была названа причиной миокардита после трансплантации сердца [43] и как возможный этиологический агент неблагоприятных событий после стентирования коронарной артерии [152].

ПВИ связывают с заболеваниями почек [232]. Наиболее частым проявлением является аплазия эритроцитов у реципиентов почечного трансплантата. Также ПВИ может являться причиной поражения почек, таких как острая тромботическая микроангиопатия [184], фокально-сегментарный гломерулосклероз, коллапсирующая гломерулопатия [55], постинфекционный гломерулонефрит. Показано, что PVB19 может запускать различные механизмы, вовлеченные в эти почечные патологии, включая воспалительные изменения в внутрипочечных мелких и средних кровеносных сосудах, цитопатический эффект в гломерулярных эпителиальных или эндотелиальных клетках, а также массивное отложение иммунных комплексов на субэндотелиальных клетках [183, 227, 232].

ПВИ может вызывать целый ряд заболеваний печени: повышение уровня трансаминаз, острый гепатит, фульминантную печеночную недостаточность [216], хронический гепатит, синдром фатальной активации макрофагов и фиброзный холестатический гепатит [151]. Согласно исследованию, проведенному Mihály et al., гепатит, связанный с PVB19, может встречаться у 4,1% пациентов [149], вне зависимости от возраста. В печени, как и в других тканях, присутствие ДНК PVB19 обнаруживают в биопсийных пробах или после вскрытия [113]. На основании обнаружения ДНК PVB19 в ткани печени у детей было сделано предположение, что PVB19 является возможным возбудителем гепатита или гепатита с анемией и даже фульминантной печеночной недостаточности [151,

231]. Совместное заражение PVB19 и другими гепатотропными вирусами может привести к выраженной печеночной недостаточности с тяжелым исходом [29].

Неврологические осложнения PVB19 могут быть более частыми у людей с ослабленным иммунитетом, имеющих другие заболевания [64]. Но осложнения также могут возникать у иммунокомпетентных детей и взрослых при острой или хронической парвовирусной инфекции. Наиболее распространенным неврологическим проявлением, связанным с PVB19, были энцефалитные синдромы (38,8% от общего числа, описанных в литературе) с возможными смертельными исходами и долговременными неврологическими осложнениями [143]. Сообщалось о случаях PVB19-ассоциированной периферической невропатии, возникающей в виде парестезии, дизестезии, паралича черепных нервов, невропатии зрительного нерва, мультиплексного мононеврита или острой вегетативной сенсорной и моторной невропатии. Механизм поражения в значительной степени неясен, однако наиболее вероятные – это молекулярная мимикрия, некротический васкулит через отложение иммунных комплексов (с основным миелиновым белком) или возможная локальная репликация вируса [28, 45, 80, 231].

Кожные симптомы ПВИ – частое проявление инфекции. Они варьируют от эритематозных высыпаний до пурпурно-петехиальной сыпи, псевдо-рожистого воспаления [61, 190] и склеродермии [169]. Механизм, в основном, обусловлен формированием иммунных комплексов, но PVB19 также может непосредственно инфицировать эндотелиальные клетки и дермальные фибробласты, вызывая повреждения клеток, как при склеродермии. PVB19 также может активировать повышенную экспрессию фактора некроза опухоли - альфа (TNF- α) и отложения комплексов C5b-9 на эндотелиальных клетках сосудов [169]. ДНК PVB19 обнаруживалась в образцах биопсии кожи инфицированных пациентов, что позволило предположить прямую инфекцию дермальных сосудов, что в свою очередь приводило к повреждению тканей [202].

Иммуносупрессия является основным фактором риска инфекции при трансплантации. У пациентов, перенесших пересадку органов или тканей, имеется

повышенный риск первичного инфицирования, вторичной PVB19 вирусной реактивации из-за тяжелой иммуносупрессии, а также передачи PVB19 при переливании крови или ее компонентов и/или получения зараженного органа или ткани от донора, так как ПВИ не входит в список обязательных к тестированию инфекций для донорства крови, органов и тканей [1, 223]. Наиболее распространенным осложнением ПВИ после трансплантации является анемия. Сообщается о случае чистой красноклеточной аплазии, вызванной парвовирусом В19, у реципиента трансплантата сердца [114], о рецидивировавшей чистой красноклеточной аплазии у реципиента гепаторенального трансплантата с хронической парвовирусной В19 инфекцией [198], о развитии тяжелой рефрактерной и трансфузионно-зависимой анемии у реципиента сердца с вирусной нагрузкой более, чем 10^9 вирусных копий PVB19 [165]. Описаны случаи рецидивирования анемии до 7-9 раз у двух реципиентов почки с инфекцией PVB19. После внутривенного введения иммуноглобулинов, наступала временная нормализация уровня гемоглобина и снижение вирусной нагрузки PVB19 [92].

У реципиентов органов и тканей PVB19 может вызывать панцитопению, неврологические заболевания. Основными гистопатологическими картинами ПВИ аллотрансплантата почки PVB19 являлись тромботическая микроангиопатия и коллапсирующая гломерулопатия, также наблюдалось повышение уровня креатинина и протеинурии [66].

При анализе данных по 98 случаям ПВИ после трансплантации органов и тканей анемия наблюдалась в 98,8% случаев, лейкопения имела место у 37,5% пациентов, тромбоцитопения – у 21,0% пациентов. Кожная сыпь возникла в 13,3% случаев, артралгия – в 6,0% случаев. Связанная с PVB19 анемия сопровождалась органо-инвазивными проявлениями у 11% пациентов, включая миокардит, пневмонию, гепатит, коллапсирующую гломерулопатию. Тромботическая микроангиопатия была отмечена у 4% пациентов. Потеря аллотрансплантата, отторжение или дисфункция (или недостаточность приживления у пациентов с ТГСК) имели место у 10,4% пациентов. Также сообщалось о коинфекциях PVB19

и CMV, HHV6 (1% пациентов). Случаи смерти, связанные с кардиогенным шоком и миокардитом, зафиксированы у 3% пациентов с ПВИ [155].

Опосредованная трансфузией ПВИ встречается редко, но вызывает тяжелые гематологические нарушения. Сообщается об иммунной тромбоцитопении, развившейся у пациента после трансфузии эритроцитарной массы, полученной от донора с вирусной нагрузкой $1,1 \times 10^4$ RVB19 копий ДНК/мл [179]. Также сообщается о гипертермии и прогрессирующей тромбоцитопении у пациента с диабетической нефропатией, эритробластопении у пациента с серповидно-клеточной анемией, получивших эритроцитарную массу [128]. В исследовании Satake M et. al. описаны различные симптомы, такие как ретикулоцитопения, задержка восстановления эритроцитов после химиотерапии, аплазия эритроцитов, сыпь или лихорадка у реципиентов после гемотрансфузий [216].

RVB19 может проникать через плаценту и инфицировать плод [49]. Трансплацентарная передача может происходить примерно в 30–50% случаев и приводить к водянке плода и/или смерти плода в ~ 10% случаев [221]. Инфекция эритробластов плода вызывает блокировку эритропоэза, результат которой будет зависеть от стадии развития плода, а также от зрелости и эффективности иммунного ответа как матери, так и плода. Так, уровни материнских IgG антител к RVB19 выше у матери, чем у плода, в то время как уровни вирусной ДНК были выше в крови плода [154]. Вирус может быть обнаружен в эритроидных клетках-предшественниках в печени и / или костном мозге в зависимости от гестационного возраста, в эритроидных клетках, циркулирующих в сосудах нескольких тканей, в эндотелиальных клетках плаценты и в околоплодных водах [180]. Характерна тяжелая анемия, часто с лейкоэритробластическими реакциями в крови и признаками гепатита, и тромбоцитопения [88]. Другими зарегистрированными осложнениями инфекции были сердечная недостаточность и некроз миокарда [78], изолированные выпоты плода [171].

Новорожденные после внутриутробной ПВИ, могут иметь гематологические нарушения, сходные с таковыми при персистирующей инфекции RVB19. Истинная эритроцитарная аплазия является наиболее

описанной врожденной патологией. Врожденная анемия может сопровождаться такими гематологическими нарушениями, как тромбоцитопения и преходящий лейкоэритробластоз [204, 225]. Неврологические симптомы, в основном задержки развития, а также судороги и гидроцефалия, могут быть прямыми последствиями вирусной инфекции или косвенно связаны с тяжелой анемией при внутриутробном развитии и при рождении [160]. Другие разнообразные ассоциации включают асцит [115], поражения костей и помутнение роговицы [44].

1.4 Парвовирусная инфекция в группах риска

По принципу повышенной вероятности возникновения ПВИ и серьезности последствий инфицирования, зависящих от механизмов патогенеза, отсутствия иммунитета и неспособности организма адекватно реагировать на развитие инфекции, можно выделить следующие группы повышенного риска: беременные, лица, страдающие хроническими гематологическими заболеваниями, больные с иммунодефицитными состояниями, с хроническими инфекционными заболеваниями, больные, получающие донорскую кровь и ее компоненты.

1.4.1. Лица, не имеющие иммунитета к ПВИ

I. Беременные женщины

У неиммунных, серонегативных беременных женщин PVB19-инфекция может передаваться через плаценту нерожденному ребенку. Трансплацентарная передача может происходить примерно в 30–50% случаев. По литературным данным, PVB19-инфекция матери увеличивает риск потери плода в 2,68 раза, самопроизвольного аборта – в 2,42 раза и мертворождения – в 3,53 раза по сравнению с неинфицированными беременными женщинами. Частота потери плода у беременных, инфицированных B19, составляет 7,6%, водянки плода – 9,3% [221]. Риск смерти плода составляет от 3% до 11%, если материнская инфекция возникает в первые 20 недель беременности [110]. Сообщается, что ПВИ обнаружена у 19,8% из 116 женщин с неоднократными самопроизвольными выкидышами, против 11% среди 136 беременных женщин [123]. Инфекция PVB19

может протекать без симптомов у будущей матери, и причина потери плода может остаться невыявленной [77]. Авторы считают, что отсутствие эпидемиологического надзора и вирусологических исследований приводит к неточным оценкам количества случаев потери плода, обусловленных ПВИ, и связанных с ними факторов риска, таких как контакты беременной женщины с источниками инфицирования [98]. Участие PVB19 в патологии плода может быть недостаточно диагностировано и, следовательно, более распространено, чем считалось ранее.

II. Лица, страдающие хроническими гематологическими заболеваниями (с укороченной эритроцитарной выживаемостью)

Риск опасных для жизни осложнений и риск передачи ПВИ при переливаниях значительно выше у людей с хроническими гематологическими заболеваниями. Недавняя ПВИ (IgM+ к PVB19) установлена у 20% пациентов с гематологическими нарушениями, сопровождающимися обострением анемии [163, 187].

Сообщается о выраженной анемии с тяжелым гемолизом у больного с комбинированной гетерозиготной серповидно-клеточной бета-талассемией [46]. Исследование 90 пациентов с множественной трансфузионной бета-талассемией показало высокую серопозитивность к PVB19 (81%) и высокие положительные значения анти-PVB19 IgM (41%) [122].

ПВИ осложняет течение гематологических заболеваний, протекающих с разрушением эритроцитов на фоне паразитарных инвазий, таких как малярия. При этом риск развития осложнений увеличивается в 2,23 – 2,44 раза [218], у детей до 5 лет риск летального исхода составляет $RR = 13,7$ [3].

1.4.2. Больные с иммунодефицитными состояниями

I. Пациенты в состоянии иммуносупрессии, перенесшие операцию по пересадке органов или костного мозга (независимо от того, подвергались ли они ранее воздействию PVB19).

Искусственная иммуносупрессия необходима после трансплантации органов и тканей. В этих условиях ПВИ является редкой, но клинически значимой инфекцией, которая в посттрансплантационный период может вызывать осложнения [155].

Так, распространенность PVB19 у детей, перенесших трансплантацию, составляла 9,3%. Вирусная нагрузка ДНК PVB19 с вероятностью недавней первичной инфекции, была выше, чем у взрослых пациентов, у которых чаще наблюдалась реактивация ПВИ. Виремия коррелировала с анемией и иммуносупрессией [92, 235].

ПВИ является характерным осложнением в случаях острого лимфоцитарного лейкоза - основного типа лейкоза у детей, а также других онкологических заболеваний у детей. [8]. Взрослые с острыми и хроническими лимфолейкозами и лимфопролиферативными заболеваниями также подвержены ПВИ, так как часто получают антилимфоцитарную терапию, и терапию моноклональными антителами.

При ретроспективном анализе данных 371 реципиента трансплантата органов или тканей было выявлено, что серопозитивными к PVB19 были 82% реципиентов. У 5,5%, 6,7% и 5,7% реципиентов печени, сердца и костного мозга соответственно наблюдалась ДНКемия. В контрольной группе частота обнаружения ДНК PVB19 составляла 2,5%. [130].

II. Больные, получающие донорскую кровь и ее компоненты

Сравнение пациентов, получавших и не получавших гемотрансфузии, выявило значительно более высокий уровень сероревалентности у людей, получавших донорскую кровь и ее компоненты. Обнаружение PVB19 ДНК в донорской крови не является редким событием. Уже в исследованиях, проведенных в 1990-х годах, сообщалось об обнаружении ДНК PVB19 в 0.03-0.6% образцов донорской крови [60]. Около 30% потенциальных доноров крови, начиная с 18 лет, не имеют антител против PVB19 и, следовательно, подвержены инфицированию PVB19. Так как острая ПВИ у иммунокомпетентных людей часто протекает бессимптомно, доноры в острой фазе инфекции могут участвовать в

кроводачах. При этом данная донация будет содержать высокий титр PVB19 и низкий титр защитных IgG антител [117].

При исследовании 5020 архивных образцов донорской крови в США, собранных в 2000 и 2003 годах, распространенность ДНК PVB19 составила 0,88%. Подобные исследования проводились также в Нидерландах, Бельгии, Австрии, Германии, Дании и Китае. В каждом регистрировалось присутствие в образцах ДНК PVB19 в 0,39-0,61% случаев. Были зарегистрированы образцы с высокой вирусной нагрузкой выше 10^5 ДНК PVB19 МЕ/мл [117].

В связи с устойчивостью вируса ко многим процедурам инактивации, используемым в производстве продуктов крови, препараты крови могут содержать PVB19. Имеются многочисленные документальные свидетельства обнаружения PVB19 в клетках крови для переливания, в лекарственных препаратах, полученных из плазмы: в концентратах различных факторов свертывания, в препаратах иммуноглобулина, альбумина. Вирусная нагрузка в этих образцах варьировала от 1×10^2 до 1×10^6 гэкв / мл [6, 95].

Сообщается о двух случаях трансфузионной PVB19 инфекции, подтвержденной 100% гомологией последовательностей генома у донора и реципиентов. Оба пациента получали эритроциты, содержащие $3,4 \times 10^6$ и $1,8 \times 10^4$ ДНК PVB19 МЕ/мл соответственно [129]. Имеются данные о подтвержденной 100% гомологией генома трансфузионной PVB19 инфекции у реципиента эритроцитов от серонегативного донора с острой ПВИ с вирусной нагрузкой 5×10^9 ДНК PVB19 МЕ/мл [166]. У 9 реципиентов (n=18) эритроцитарной массы, полученной от доноров с вирусной нагрузкой $\geq 10^5$ МЕ/мл ДНК PVB19, также фиксировали ПВИ. Трансфузионная инфекция была подтверждена филогенетически. Но ПВИ не развивалась при меньшей вирусной нагрузке PVB19. В связи с этим было сделано предположение, что концентраты эритроцитов с вирусной нагрузкой ДНК в плазме менее 10^5 МЕ/мл от доноров, инфицированных PVB19, вероятно, не способны передавать PVB19 путем трансфузий [195].

Однако пороговая концентрация ДНК PVB19 у доноров крови, при которой возможна передача инфекции, снижается. Сообщается о трансфузионном инфицировании при переливании эритроцитов от донора с концентрацией в плазме ДНК PVB19 $1,1 \times 10^4$ PVB19 ДНК/мл [179]. А в исследовании Satake M. et al трансфузионная инфекция PVB19 произошла через концентрат эритроцитов с вирусной нагрузкой ДНК PVB19 $5,1 \times 10^3$ МЕ/мл плазмы. Данные факты подтверждены анализом последовательности генома у донора и реципиента [216].

Вместе с тем некоторыми авторами сообщается об отсутствии передачи инфекции реципиенту при получении компонентов крови от доноров с содержанием ДНК PVB19 10^6 МЕ/мл плазмы [25].

Несмотря на многочисленные свидетельства передачи PVB19 через донорскую кровь, ее продукты, ПВИ не входит в перечень обязательных к тестированию инфекции во многих странах, в том числе и в Российской Федерации [1].

III. Больные хроническими инфекционными заболеваниями

Персистирующая ПВИ, как правило, возникает на фоне иммунодефицита различного происхождения, в том числе и вторичного, как у ВИЧ-инфицированных пациентов. У ВИЧ-инфицированных пациентов невысокая распространенность ПВИ, но описанные случаи имеют тяжелые проявления, рецидивирующее течение и сложно поддаются терапии.

При анализе архивных биопсий костного мозга ВИЧ-инфицированных больных было обнаружено 8,6 % ДНК PVB19 положительных образцов [97].

Наблюдались высокие концентрации парвовируса B19 в сыворотках и костном мозге семи ВИЧ-инфицированных пациентов в течение недель/месяцев, но IgG антитела обнаружены не были [176]. Описана стойкая хроническая рецидивирующая ПВИ у ВИЧ-инфицированного пациента, с временным успехом устраняемая введением Ig [133].

Сообщается о персистирующей инфекцией B19 с отсутствием антител в крови в течение года. Восстановление иммунного ответа началось после антиретровирусной терапии [193].

В исследованиях китайских ученых было обнаружено, что у ВИЧ-положительных потребителей инъекционных наркотиков высокий уровень ДНК PVB19 (7,1%) [68].

1.5 Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции

Обнаружение антител в сыворотке крови является основным методом рутинной лабораторной диагностики парвовирусной инфекции, в то время как тесты на нуклеиновые кислоты дают дополнительную ценную информацию о виремии и присутствии парвовируса В19 в тканях [111, 197,]. Обнаружение антигена PVB19 в сыворотке с помощью моноклональных антител ИФА методом, в радиоиммунных анализах или иммуноблотах, а также культуральная диагностика в повседневной лабораторной работе используются нечасто в связи с трудоемкостью и длительностью процедур. Обнаружение антигена PVB19 в отдельных клетках, в срезах тканей с помощью иммуногистологии или электронной микроскопии, необходимые для индикации вируса, также не включены в практическую работу клинико-диагностических лабораторий.

Лабораторный диагноз инфекции PVB19 должен опираться на многопараметрический подход, максимально сочетающий как обнаружение вирусных компонентов, так и оценку ответной иммунологической реакции организма на ПВИ. В связи со схожестью симптоматики с другими экзантемными и аутоиммунными заболеваниями необходимы методы, которые позволят установить этиологию заболевания и провести дифференциальную диагностику [185, 206].

1.5.1 Серологические методы диагностики PVB19

Серологическая диагностика для выявления специфического иммунного ответа до сих пор считается стандартным и наиболее широко используемым методом лабораторной диагностики ПВИ. Серологические исследования показали, что, несмотря на генетическое разнообразие (3 генотипа), PVB19 имеет

один серотип, поэтому иммуноферментный анализ способен выявлять антитела к PVB19 1-3 генотипов. Проводится параллельное обнаружение специфических анти-B19 IgM и IgG антител.

Обнаружение IgM антител и сероконверсия IgG в парных образцах сыворотки являются наиболее надежными маркерами острой инфекции PVB19. Потенциально полезным для дифференцирования прошлых и недавних инфекций является измерение avidности IgG [26]. Для пациентов с ослабленным иммунитетом из-за дефицита в выработке антител требуется обнаружение ДНК PVB19.

В настоящее время существует достаточно большое число зарубежных коммерческих диагностических наборов для определения специфических анти-B19 IgM и IgG антител в качественном и количественном формате. Однако, тест-систем отечественного производства до сих пор не разработано.

1.5.2 Молекулярно-биологические методы диагностики PVB19

Обнаружение нуклеиновых кислот в крови, сыворотке или плазме важно как для диагностики ПВИ, так и для скрининга продуктов крови на наличие PVB19. Обнаружение PVB19 может иметь диагностическую ценность на очень ранней фазе инфекции, до появления антител, а также в фазе позднего выздоровления [197]. Метод полимеразной цепной реакции является самым диагностически ранним способом обнаружения вируса. В настоящее время в клинической лабораторной практике при работе с PVB19 используют метод ПЦР в режиме реального времени как для качественной, так и для количественной идентификации ДНК PVB19. Для простого генотипирования PVB19 используются праймер-специфические ПЦР [140].

ДНК PVB19 обнаруживается в дыхательных путях и крови через неделю после заражения, и вiremия с высоким титром, определяемая только молекулярно-биологическими методами, присутствует от нескольких дней до недели, после чего вiremия сохраняется на более низких уровнях [72]. ПЦР

может быть единственным методом диагностики для выявления инфекции PVB19 у плода при выявленной инфекции у беременной женщины. Возможная персистенция PVB19 в крови среди иммунокомпетентных субъектов значительно усложняет интерпретацию позитивности ПЦР. Для этого в качестве диагностического критерия был предложен порог в 10^4 мкг/мл ДНК PVB19 [111]. Для определения вирусной нагрузки в пулах донорской крови также используют количественный вариант ПЦР метода. Выбраковка пула происходит при вирусной нагрузке выше 10^4 МЕ/мл [147, 95].

В настоящее время количественные ПЦР-методы в реальном времени рассматриваются как стандартный аналитический метод молекулярного обнаружения PVB19 [194]. При этом у тест-систем должны быть калиброванное и стандартизированное количественное определение вирусной мишени и возможность обнаружения всех генотипов PVB19. Оба эти требования могут быть выполнены, используя международные стандарты [40].

Таким образом, интерпретация комбинации результатов серологических методов (определения специфических анти-B19 IgM и IgG антител) и молекулярно-биологических методов (количественное или качественное определение ДНК PVB19) позволяет поставить диагноз активной, недавней или перенесенной инфекции [143] (таблица 1).

Таблица 1 - Интерпретация результатов лабораторных исследований специфических анти-B19 IgM и IgG антител, ДНК PVB19

анти-B19 IgM	анти-B19 IgG	ДНК PVB19	Предположительный диагноз
-/+	-	+	Острая инфекция, период «серологического окна»
+	-/+	+	Острая инфекция, начальная стадия первичной инфекции
+/-	+	+	Поздняя стадия первичной инфекции / рецидив. Недавно перенесенная инфекция
-	+	+/-	Стадия выздоровления / недавно перенесенная инфекция
-	+	-	Давно перенесенная инфекция

Заключение

Изучению ПВИ посвящены многочисленные исследования, что свидетельствует о медицинской значимости заболевания. Специальная литература представлена широким спектром работ, в основном зарубежных авторов, характеризующих особенности распространения парвовируса В19, клинические проявления и осложнения ПВИ, роль иммунной системы в борьбе с инфекцией или в развитии клинических проявлений. Определены биологические характеристики парвовируса В19, этапы репродукции в чувствительных клетках. Большое внимание уделено изучению молекулярно-генетической структуры РVВ19. Генетическое разнообразие В19V является предметом интереса для понимания путей эволюции вируса. Постоянное развитие инновационных методов секвенирования привело к росту доступных данных о нуклеотидных последовательностях и генотипах парвовируса В19 и их распространении в мире. Тем не менее, сведений о разделении геновариантов на кластеры и их особенностях недостаточно. Применение молекулярно-генетических методов имеет решающее значение для глубокого понимания динамики эволюции вируса и молекулярной эпидемиологии.

Накоплен большой опыт в лабораторной диагностике ПВИ, продолжается разработка более совершенных диагностических методов и алгоритмов определения фактической патогенетической роли В19V в заболеваниях человека. Однако в научной литературе отсутствуют данные по алгоритмам лабораторной диагностики ПВИ в группах риска (больные с иммунодефицитными состояниями, гематологические больные). Кроме того, остаются малоизученными такие вопросы, как распространение ПВИ в ряде стран Евразии и Африки, молекулярно-генетическая характеристика РVВ19 и циркуляция генотипов парвовируса В19 на этих территориях. Также, несмотря на очевидную медицинскую значимость, недостаточно изучено распространение ПВИ в группах риска.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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-Петербургский научно-исследовательский институт 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». Исследование выполнено с использованием иммунологических, вирусологических, молекулярно-генетических и статистических методов.

2.1 Материалы исследования

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 2.

Постановка диагноза, клинический осмотр больных, общеклинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, исследования на малярийный плазмодий проводились врачами соответствующих лечебных учреждений.

Таблица 2 - Числовая характеристика лабораторно обследованных групп

Характеристика группы	Количество
Образцы крови условно здоровых лиц, проживающих в г. Санкт-Петербург	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" (г. Санкт-Петербург)	231
Образцы крови пациентов с алло-ТГСК из клиники «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой» (г. Санкт-Петербург)	54
Образцы крови пациентов госпиталя г. Фрия Гвинейской Республики с диагнозом «малярия»	316
ВСЕГО	2885

2.2 Методы исследования

В работе были использованы серологические методы исследования маркеров ПВИ (обнаружение IgM-антител и IgG-антител к PVB19) методом твердофазного иммуноферментного анализа, молекулярно-генетические методы (выявления и определения вирусной нагрузки PVB19 в периферической крови методом полимеразной цепной реакции), секвенирование ДНК PVB19 проводилось методом капиллярного секвенирования (секвенирование по Сэнгеру). Перечень лабораторных исследований, проведенных в ходе выполнения работы, представлен в таблице 3.

Таблица 3 - 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	738
Выявление и определение вирусной нагрузки ДНК PVB19 в периферической крови методом ПЦР с помощью коммерческого набора	1878
Секвенирование PVB19	30
Всего исследований	5467

Иммуноферментный анализ

Качественное определение IgM-антител к PVB19 проводили с использованием диагностического набора «Anti-Parvovirus B19 ELISA IgM» (EUROIMMUN, Германия) (тест-системы) согласно инструкции производителя.

Количественное и качественное определение IgG-антител к PVB19 проводили с использованием диагностического набора «Anti-Parvovirus B19 ELISA IgG» (EUROIMMUN, Германия) согласно инструкции производителя.

Молекулярно-генетические методы

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

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Выявление и/или количественное определение ДНК PVB19 в образцах крови, определение вирусной нагрузки пулов при анализе чувствительности разрабатываемого метода было проведено методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® Parvovirus B19-FL» (ФБУН ЦНИИ

Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкции производителя в качественном или количественном формате.

Для амплификации ДНК PVB19, для секвенирующей реакции использовали смесь следующего состава: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НCl, (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Условия проведения амплификации: денатурация - при 95⁰С в течение 5 минут, затем 30-40 циклов амплификации в режиме: 95⁰С – 20-40 сек, 55-65⁰С – 20-30 сек, 72⁰С – 30-90 сек; финальная элонгация при 72⁰С – 5 мин. Результаты ПЦР учитывались визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием.

Для амплификации и секвенирования продукта были использованы специфические праймеры (Синтол, Россия). Основываясь на литературных данных [56, 140, 148], а также, используя программу NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям, были подобаны последовательности праймеров и флуоресцентных зондов (таблица 4).

Таблица 4 - Нуклеотидные последовательности праймеров, дополнительно использованные для секвенирования региона NS1/VP1 PVB19

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
PVB19 1F	CAATTGTCACAGACACCAGTA
PVB19 1R	ACTTAGCCAGTTGGCTATACCT
PVB19 2F	CCCGCGCTCTAGTACGCCA
PVB19 2R	TTGCGGGGGCCCAGCTTGTA

Продукт амплификации и секвенирующей реакции очищали двумя методами:

1. Метод спиртового осаждения в присутствии ацетата натрия.

В 20 мкл продукта амплификации вносили смесь, состоящую из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена. Образовавшуюся смесь инкубировали в присутствии охлажденного 96% этилового спирта 15 минут при комнатной температуре. Центрифугировали при 14000 об/мин, 4°C 15 минут. После удаления супернатанта осадок дважды промывали охлажденным 70% этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования на холоду. Промытый осадок сушили.

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 TE-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. Образцы плазмы с вирусной нагрузкой 10^2 МЕ/мл и выше были использованы для секвенирования. Для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров в трех повторностях для каждой пары праймеров брали очищенный фрагмент ДНК PVB19 с концентрацией 50-100 нг 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 Gene Bank изоляту J35 (AY386330) [56], совместно с дополнительными праймерами (Таблица 4)

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 PVB19 к генотипам был выбран фрагмент генома, включающий консервативный фрагмент 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 Gene Bank нуклеотидными последовательностями референсных образцов [140].

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [126, 224]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей (Neighbor-joining), позволяющим осуществлять оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» с использованием "Maximum Composite Likelihood" модели, для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) для 1000 повторов.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Значение критерия χ^2 сравнивалось с критическими значениями для соответствующего числа степеней свободы. В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости.

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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОТДЕЛЬНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Учитывая, что методов специфической профилактики парвовирусной инфекции не разработано, а постинфекционные иммуноглобулины G к PVB19 сохраняются в крови переболевших пожизненно, о распространении ПВИ в той или иной популяции можно судить по показателям гуморального иммунитета. Достаточно долго (от нескольких недель до нескольких лет) сохраняется в крови и ДНК парвовируса В19. Эти два лабораторных маркера могут служить как для оценки популяционного иммунитета (IgG-антитела), так и для выявления случаев сравнительно недавно перенесенного заболевания (ДНК вируса).

Лабораторные маркеры ПВИ (специфические антитела класса IgG к PVB19 и ДНК PVB19) были обнаружены в образцах крови, полученных от условно здоровых лиц из Европейской части РФ, Восточной Европы, Средней Азии, Западной Африки. Всего лабораторно исследовано 2284 образца крови жителей указанных регионов в возрасте от 18 до 89 лет, из которых 59,4% и 40,6% лиц мужского и женского пола, соответственно. На анти-IgG антитела исследованы 2284 образца, на ДНК PVB19 – 2052 образца.

3.1 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови условно здоровых жителей г. Санкт-Петербург (Российская Федерация)

Образцы крови условно здоровых жителей г. Санкт-Петербург (n=317) были получены от лиц в возрасте 18 – 87 лет (средний возраст $42,3 \pm 12,09$, медиана 39,0 лет) и распределены на 4 возрастные группы. Общая доля мужчин составила 32,8%, женщин – 67,2%. Специфические IgG антитела к PVB19 были обнаружены в $62,1 \pm 2,72\%$ (197 из 317) образцов и выявлялись во всех возрастных группах (таблица 5).

Таблица 5 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых жителей г. Санкт-Петербург в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс.)	Из них IgG + к PVB19	
		Количество (абс.)	Доля (%), М±m
18-20	18	6	33,3±11,11
21-30	68	40	58,8±5,97
18-30	86	46	53,5±5,38
31-40	78	40	51,3±5,66
41 и старше	153	111	72,5±3,61
Всего	317	197	62,1±2,72

Наименьшая доля серопозитивных лиц выявлена в группе 18-20 лет; она составила 33,3±11,1%. В возрастных группах 21-30 и 31-40 лет доля IgG-положительных к PVB19 проб возрастает, составляя 58,8±5,9% и 51,3±5,66%, соответственно. Совокупно доля серопозитивных 18-30 лет составила 53,5±5,38%, максимальная доля положительных находок, равная 72,5±3,61%, была обнаружена в возрастной группе 41 и старше. Выявленные различия статистически значимы ($df=3$, $\chi^2=17,623$, $p<0,001$).

Гендерный анализ в целом не выявил существенных различий между серопозитивными лицами мужского и женского пола: 66,5% против 62,0%, соответственно ($df=3$, $\chi^2=2,399$, $p=0,494$). При этом доля серопозитивных женщин была незначительно выше среди лиц 18-20 лет и старше 41 года; серопозитивные мужчины чаще выявлялись в возрасте от 21 до 40 лет (рисунок 8).

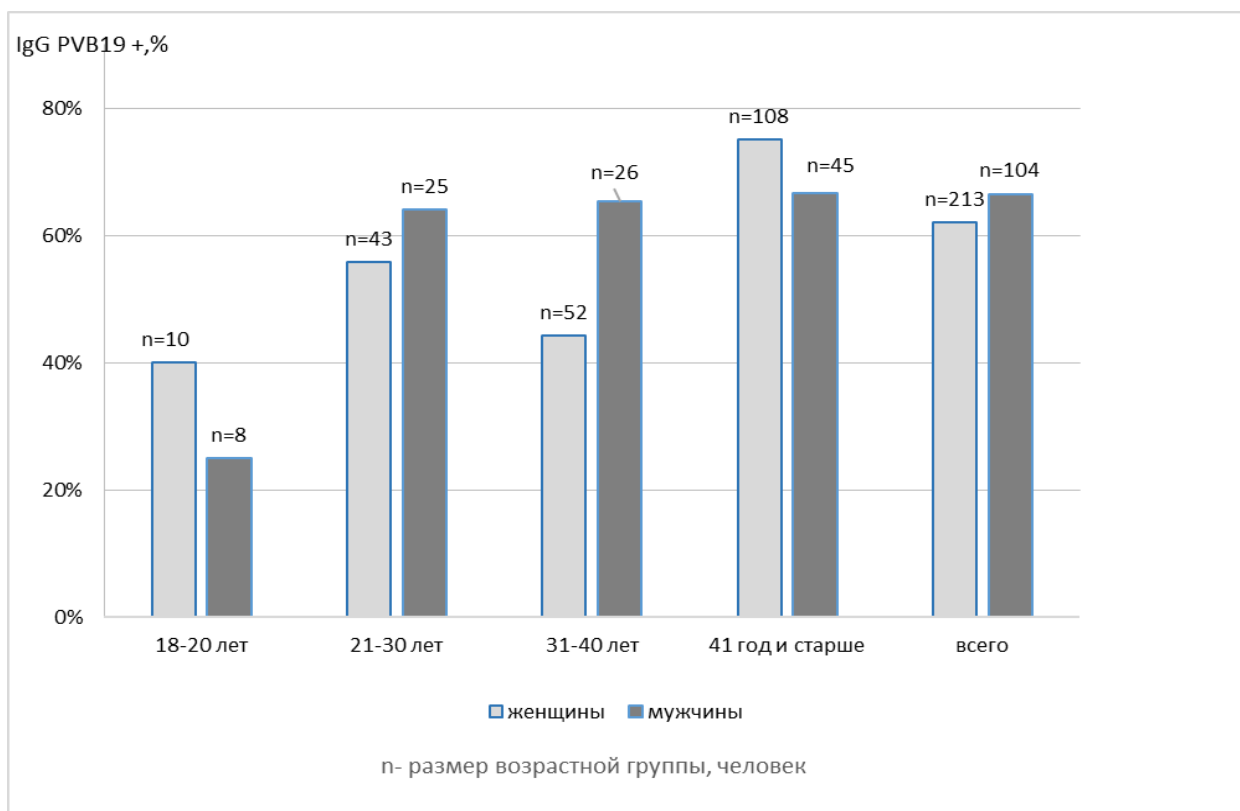


Рисунок 8 - Доля серопозитивных к PVB19 образцов крови условно здоровых жителей г.Санкт-Петербург в разных возрастных группах

В 15 образцах ($4.7 \pm 1.19\%$) была обнаружена ДНК PVB19; положительные образцы плазмы выявлялись во всех возрастных группах (таблица 6).

Таблица 6 - Выявление ДНК PVB19 в плазме крови условно здоровых жителей г.Санкт-Петербург в разных возрастных группах

Возрастная группа (лет)	Количество исследованных образцов (абс)	Из них ДНК + PVB19	
		Количество (абс)	Доля %, $M \pm m$,
18-20	18	2	$11,1 \pm 7,41$
21-30	68	7	$10,3 \pm 3,69$
18-30	86	9	$10,5 \pm 3,30$
31-40	78	2	$2,6 \pm 1,79$
41и старше	153	4	$2,6 \pm 1,29$
Всего	317	15	$4,7 \pm 1,19$

Наибольшее число ДНК РVВ19-положительных образцов получено в возрастных группах 18-20 лет и 21-30 лет ($11,1 \pm 7,41\%$ и $10,3 \pm 3,69\%$ соответственно). В целом в группе 18-30 лет доля выявленных образцов с ДНК РVВ19 составила $10,5 \pm 3,30\%$. В старших возрастных группах 31-40 лет и 41 год и старше доля образцов, содержащих вирусную ДНК, снижается, составляя $2,6 \pm 1,79-1,29\%$. Выявленные различия статистически достоверны ($df=3$, $\chi^2=8.627$, $p=0.035$). Отмечается высокая обратная корреляция между возрастом и долей ДНК РVВ19-положительных образцов ($r=-0.846$), зависимость признаков статистически не значима ($p=0.267167$).

Анализ величины вирусной нагрузки ДНК-положительных проб показал, что в 8 из 15 (53,3%) вирусная нагрузка была невысокой: менее 10^3 МЕ/мл ДНК РVВ19 (Таблица 7). В трех образцах (20,0%) вирусная нагрузка определялась на уровне 10^3-10^4 МЕ/мл ДНК РVВ19; в четырех образцах крови (26,7%) – на уровне 10^5-10^6 МЕ/мл ДНК РVВ19. Ввиду практически равных значений долей ДНК+ РVВ19 образцов в первой и во второй возрастных группах, а также в третьей и четвертой группах, образцы были объединены в 2 группы – 21-30 лет и 31 год и старше.

Таблица 7 - Вирусная нагрузка (МЕ/мл) в образцах крови условно здоровых жителей г.Санкт-Петербурга в зависимости от возраста

Возрастная группа (лет)	ДНК РVВ19+ (абс)	$<10^3$ ДНК РVВ19	$10^3 \leq$ ДНК РVВ19 $< 10^4$	$10^5 \leq$ ДНК РVВ19 $< 10^6$
18-30	9	33,3%	22,2%	44,4%
31 год и старше	6	83,3%	16,7%	-
Всего	15	53,3%	20,0%	26,7%

В группе взрослых 18-30 лет треть образцов ($n=3$) содержит менее 10^3 МЕ/мл ДНК РVВ19. В старшей группе (31 год и старше) 83,3% образцов ($n=5$) имели низкую вирусную нагрузку. Содержание ДНК РVВ19 10^3-10^4 МЕ/мл выявлено в 22,2% образцов в группе 18-30 лет и в 16,7% в группе 31 и старше. Вирусная В19 ДНК в количествах от 10^5 до 10^6 МЕ/мл определялась только в

группе 18-30 лет в 44,4%. Образцов плазмы с более высокой вирусной нагрузкой ($\geq 10^6$ МЕ/мл) не выявлено.

В целом ДНК парвовируса В19 в образцах крови женщин и мужчин выявлялась на одном уровне – $4,7 \pm 1,45\%$ и $4,8 \pm 2,10\%$ от числа обследованных женщин и мужчин соответственно. Статистические различия в группах не выявлены ($df=1$, $\chi^2=0.002$, $p=0.965$). Однако наблюдаются различия в частоте выявления ДНК РVВ19 у мужчин и женщин в зависимости от возраста обследуемых. В возрастной группе 18-30 лет доля ПЦР-положительных проб у мужчин меньше и составляет 6,1% против 13,2% у женщин. В то время как в группе старше 31 года противоположная ситуация, и доля ПЦР-положительных образцов у мужчин выше – 4,2% у мужчин и 1,9% у женщин.

Максимальная доля образцов с вирусной РVВ19 нагрузкой выявляется в группе лиц 18-30 лет (10,5%). В этой же группе имеются пробы с высокой вирусной нагрузкой до 10^6 МЕ/мл ДНК РVВ19. При этом доля ДНК-положительных образцов, полученных от женщин, выше. В группе 31 год и старше доля положительных находок значительно ниже (2,6%), содержание вирусной ДНК в образцах меньше. Преобладают пробы (83,3%) с низкой вирусной нагрузкой до 10^3 МЕ/мл ДНК РVВ19.

Таким образом, среди условно здоровых жителей Санкт-Петербурга в целом выявлено около 62 % серопозитивных к РVВ19 лиц, с тенденцией к увеличению их доли в старших возрастных группах ($r=0.164$, $p=0.003$), без существенных различий по гендерному признаку. Установлено преобладание ДНК-содержащих проб среди лиц 18-30 лет, у которых регистрировали и наиболее высоко копияные образцы, что свидетельствует о более активной циркуляции вируса среди молодых людей до 30 лет.

Иначе формировался коллективный иммунитет к РVВ19 в организованном коллективе, который состоял из преподавателей и курсантов (находящихся в специальных условиях проживания) военного училища гСанкт-Петербург.

Были исследованы 500 образцов крови лиц в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст – 25,2 года, медиана – 21 год). Подавляющее число

обследованных, а именно 458 человек – мужчины (91,6%). Серопревалентность к PVB19 в организованном коллективе оказалась существенно выше ($p=0.005$), чем в среднем среди жителей города, и составила $85,8\pm 1,56\%$ (таблица 8).

Отличительной особенностью данной популяции является высокое количество (190 из 223 человек) серопозитивных к PVB19 лиц уже среди 18-20-летних курсантов – их доля составила $85,2\pm 2,38\%$. Высокий уровень гуморального иммунитета сохранялся без статистически значимых изменений во всех обследованных возрастных группах ($df=3$, $\chi^2=3,966$, $p=0.266$).

Таблица 8 - 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 (%), $M\pm m$
18-20	223	190	$85,2\pm 2,38$
21-30	173	145	$83,8\pm 2,80$
31-40	64	60	$93,8\pm 3,03$
41 год и старше	40	34	$85,0\pm 5,65$
Всего	500	426	$85,8\pm 1,56$

Доля IgG-положительных образцов у лиц мужского пола ($86,7\pm 1,59\%$) была выше, чем у женщин ($69,0\pm 7,13\%$), однако весьма низкое количество обследованных в данной популяции женщин (42 из 500 человек) не позволяет считать выявленные гендерные различия достоверными.

При исследовании образцов крови курсантов на ДНК PVB19 положительные результаты были получены в $22,6\pm 1,87\%$ случаев ($n=113$); ДНК вируса определялась с разной частотой во всех возрастных группах (Таблица 9).

Максимальное число и доля ДНК-положительных образцов, а именно 77 образцов или $34,5\pm 3,18\%$, наблюдалось среди лиц 18-20 лет. В возрастной группе 21-30 лет доля ДНК-положительных проб снизилась почти в 2 раза – до

18,5±2,95%. Более существенное снижение положительных находок отмечалось в возрастной группе 31 год и старше – до 3,8±1,89%. Выявленные различия статистически достоверны ($df=2$, $\chi^2=40.717$, $p<0,001$). Все образцы, содержащие ДНК PVB19, были IgG положительными.

Таблица 9 - Выявление ДНК PVB19 в плазме крови лиц из организованного коллектива в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество обследованных (абс)	Из них ДНК к PVB19+	
		Количество (абс.)	Доля (%), М±m,
18-20	223	77	34,5±3,18
21-30	173	32	18,5±2,95
31 и старше	104	4	3,8±1,89
Всего	500	113	22,6±1,87

При анализе интенсивности вирусной нагрузки выявлено преобладание образцов с невысокой вирусной нагрузкой (таблица 10).

Таблица 10 - Вирусная нагрузка (в МЕ/мл) в плазме крови лиц из организованного коллектива в разных возрастных группах

Возрастная группа	ДНК PVB19+ абс	$\leq 10^3$ ДНК PVB19	$10^3 \leq$ ДНК PVB19 $< 10^4$	$10^4 \leq$ ДНК PVB19 $< 10^5$	$10^5 \leq$ ДНК PVB19 $\leq 10^6$	$\geq 10^6$ ДНК PVB19
18-20	77	40,3%	32,7%	14,3%	7,8%	5,2%
21-30	32	40,6%	12,5%	31,3%	9,4%	6,3%
31 и старше	4	75%	25,0%	-	-	-
Всего	113	41,6%	26,5%	18,6%	8,0%	5,3%

Доля образцов, содержащих менее 10^3 МЕ/мл ДНК PVB19, составила 41,6% от общего числа ДНК-положительных проб.

Доля образцов с более высокой вирусной нагрузкой последовательно снижалась – ДНК РVВ19 в концентрации, равной или превышающей 10^6 МЕ/мл, было обнаружено в 5,3% образцов.

Максимальные значения содержания ДНК РVВ19 ($\geq 10^6$ МЕ/мл) были выявлены в образцах крови лиц возрастных групп 18-20 и 21-30 лет (5,2% и 6,3%, соответственно); при этом в крови одного из обследованных курсантов в возрасте 18 лет содержание ДНК РVВ19 составило $1,1 \times 10^8$ МЕ/мл. У лиц в возрасте 31 год и старше вирусная нагрузка в крови не превышала $10^3 - 10^4$ МЕ/мл ДНК РVВ19.

Таким образом, в условиях длительного контакта интенсивное формирование коллективного иммунитета к РVВ19 произошло уже среди лиц первой возрастной группы (18-20 лет), что, видимо, связано с наличием скрытой циркуляции возбудителя в данной популяции. Это предположение подтверждается тем фактом, что в образце крови с содержанием ДНК РVВ19 в концентрации $1,1 \times 10^8$ МЕ/мл, определялись вирусспецифические IgM и IgG-антитела. А общая доля серопозитивных к РVВ19 курсантов 18-20 лет (85,2%) существенно превышала показатель серопревалентности в той же возрастной группе условно здоровых жителей г.Санкт-Петербург (33,3%). Свидетельством инфекционного процесса, скрыто протекающего в обследованном организованном коллективе, является и выявление существенного количества ДНК-положительных проб и высоко-копийных образцов в группах 18-20 и 21-30 лет.

3.2 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови трудовых мигрантов из Средней Азии

В данном разделе представлены результаты изучения уровня гуморального иммунитета к РVВ19 у мигрантов из Средней Азии, находившихся в г. Санкт-Петербург по трудовой визе. Оценка доли IgG-положительных лиц важна для определения значимости данной популяции в распространении парвовирусной инфекции как среди мигрантов, так и среди постоянных жителей г.Санкт-Петербург.

Для выявления лабораторных маркеров ПВИ исследованы 114 образцов крови трудовых мигрантов из Республик Узбекистан и Таджикистан, из них 104 мужчины и 10 женщин в возрасте от 18 до 56 лет (средний возраст 33,4 года, медиана 33,5 года).

В целом, количество и доля IgG-положительных образцов составила 54 из 114 или 47,4±4,68%. Образцы крови были распределены на 3 возрастные группы. Специфические IgG-антитела были обнаружены в каждой из них (Таблица 11).

Таблица 11 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови трудовых мигрантов из Средней Азии в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс)	Из них IgG + к PVB19	
		Количество (абс)	Доля (%), M±m
18-30	50	19	38,0±6,86
31-40	33	18	54,5±8,67
41 год и старше	31	17	54,8±8,94
Всего	114	54	47,4±4,68

Наименьшая доля серопозитивных проб наблюдалась среди мигрантов 18-20 лет (12,5±11,69%). Ограниченное число образцов, полученное от лиц данного возраста (n=8), не позволило выделить их в отдельную группу. Совокупно IgG-положительные образцы крови, полученные от лиц 18-30 лет, составили 38,0±6,86% от числа исследованных образцов.

У лиц в возрасте 31 года и старше доля образцов, содержащих IgG к PVB19, возросла в среднем до 54,6 % и сохранялась на этом уровне у мигрантов старше 40 лет. Однако эти различия статистически не значимы (df=2, $\chi^2=3,126$, p=0.209).

При постановке ПЦР ДНК парвовируса В19 выявлялась в пробах крови трудовых мигрантов в единичных случаях: два ДНК-положительных образца – в возрастной группе 21-30 лет, и два – в образцах крови лиц старше 30 лет. Вирусная нагрузка в пробах не превышала 10^3 МЕ/мл.

Таким образом, при анализе возрастной структуры серопозитивных к PVB19 лиц из Средней Азии выявлено увеличение их доли в старших возрастных группах. Доля серопозитивных трудовых мигрантов в возрасте 30 лет и младше, оказалась ниже, чем доля серопозитивных жителей г.Санкт-Петербург той же возрастной группы (18-30 лет) – 38,0% и 53,5% соответственно. Однако эти различия статистически не достоверны ($p=0.082$). Достоверные различия ($p=0.05$) выявлены в группе лиц 40 лет и старше – 54% серопозитивных среди трудовых мигрантов и 72,5% среди постоянных жителей г.Санкт-Петербург.

3.2 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей Республики Сербия

На наличие маркеров ПВИ были лабораторно исследованы 552 образца крови условно здоровых жителей разных регионов Республики Сербия (Восточная Европа). Количество женщин составляло 68,1%, мужчин – 31,9%.

Образцы крови мужчин и женщин установленного возраста, были получены от лиц 18-89 лет (средний возраст – 42,0 лет, медиана – 43 года) и распределены на 4 возрастные группы. Специфические IgG к PVB19 были выявлены в каждой из них. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых жителей Республики Сербия в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных сывороток (абс.)	Из них IgG + к PVB19	
		Количество (абс.)	Доля серопозитивных (%), $M \pm m$
18-20	84	41	48,8±5,45
21-30	78	48	61,5±5,51
18-30	162	89	54,9±3,91
31-40	68	41	60,3±5,93
41 и старше	322	199	61,8±2,71
Всего	552	329	59,6±2,09

В целом доля Ig-положительных проб составила $59,6 \pm 2,09\%$ (329 из 552). Наименьшая доля серопозитивных проб регистрировалась в группе 18-20 лет ($48,8 \pm 5,45\%$). Начиная с возрастной группы 21-30 лет, доля серопозитивных образцов увеличилась до $61,5 \pm 5,51\%$ и существенно не изменялась в старших возрастных группах. Выявленные различия в возрастных группах в целом статистически незначимы ($df=3$, $\chi^2=4.845$, $p=0.184$). Вместе с тем различия между возрастной группой 18-20 лет и группами 21 год и старше статистически достоверны ($df=1$, $\chi^2=4.792$, $p=0.029$). Прослеживается прямая корреляции ($r=0.610$, сила связи по шкале Чеддока – заметная) между возрастом и показателями серопревалентности в возрастных группах.

Гендерный анализ (Рисунок 9) показал, что доля серопозитивных лиц мужского пола в целом незначительно ниже, чем доля серопозитивных лиц женского пола: 55,7% против 61,4%, различия статистически не значимы ($p=0,20$).

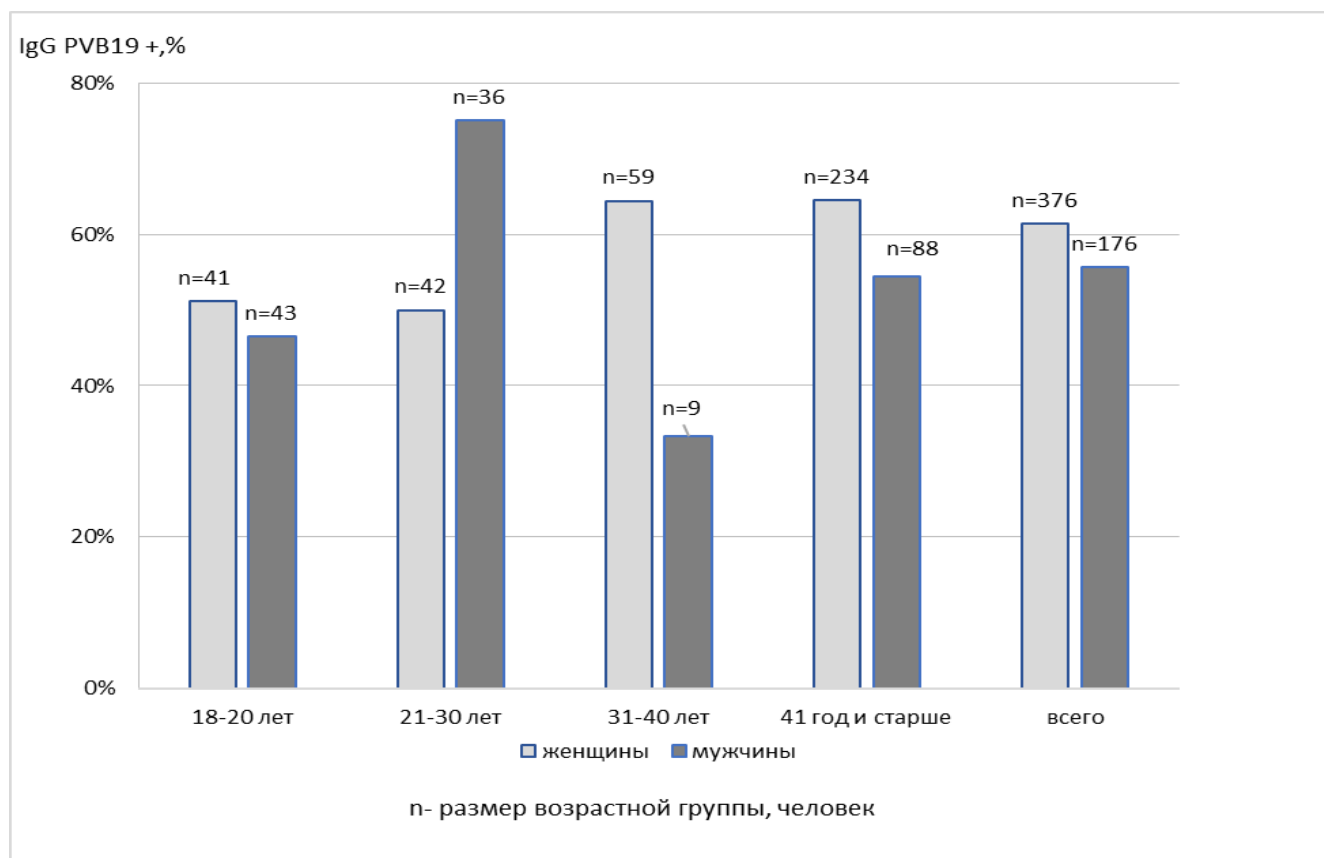


Рисунок 9 - Доля серопозитивных к PVB19 образцов крови условно здоровых жителей Республики Сербия в зависимости от пола и возраста

В целом во всех возрастных группах отмечается преобладание серопозитивных образцов, полученных от женщин, кроме возрастной группы 21-30 лет. У мужчин 21-30 лет доля IgG к PVB19 положительных образцов в 1,5 раз выше, чем у женщин того же возраста. Отмечалась тенденция к снижению доли ДНК-положительных проб от показателя 20,8% среди серопозитивных лиц второй возрастной группы до 13,6% – в возрастной группе 41 год и старше.

3.3 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей г. Нур-Султан (Республика Казахстан)

Были исследованы 480 образцов крови условно здоровых жителей Нур-Султана в возрасте от 18 до 59 лет (средний возраст $30,5 \pm 9,84$ лет, медиана – 28,0 лет). Количество мужчин составляло 73,7%, женщин – 26,3%. Образцы крови были разделены на 4 возрастные группы, в каждой из которой выявлялись специфические IgG к PVB19, а в целом антитела были обнаружены в $65,2 \pm 2,17\%$ образцов (таблица 13).

Таблица 13 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых жителей г. Нур-Султан в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс)	Из них IgG «+» к PVB19	
		Количество (абс)	Доля серопозитивных $M \pm m, \%$
18-20	72	35	$48,6 \pm 5,89$
21-30	208	129	$62,0 \pm 3,37$
18-30	280	164	$58,6 \pm 2,94$
31-40	113	79	$69,9 \pm 4,31$
41 и старше	87	70	$80,5 \pm 4,25$
Всего	480	313	$65,2 \pm 2,17$

В целом прослежена тенденция к росту доли серопозитивных образцов в старших возрастных группах ($r=0.225$, $p=0,000001$). Наименьшая доля

серопозитивных проб, а именно $48,6 \pm 5,89\%$, была выявлена среди молодых людей 18-20 лет. В возрастных группах 21-30 и 31-40 лет доля серопозитивных возросла до $62,0 \pm 3,37\%$ и $69,9 \pm 4,31\%$ соответственно. В группе лиц 41 года и старше доля позитивных IgG к PVB19 оказалась достоверно выше ($df=3$, $\chi^2=19.696$, $p<0,001$) и достигла $80,5 \pm 4,25\%$.

Гендерный анализ (рисунок 10) показал, что доля серопозитивных лиц мужского пола в целом выше, чем доля серопозитивных лиц женского пола: $69,5 \pm 2,93\%$ против $53,2 \pm 6,10\%$ ($df=1$, $\chi^2= 10.368$, $p=0.002$).

Наибольшие различия отмечаются в группе молодых людей 18-20 лет, где доля серопозитивных мужчин в 2,7 раза больше, чем женщин: $67,5 \pm 2,99\%$ и $25,0 \pm 5,29\%$ соответственно. Различия статистически достоверны ($p=0.0004$). В возрастной группе 21-30 лет различия уменьшаются ($65,1 \pm 3,4\%$ и $47,2 \pm 6,10\%$), и далее – у лиц от 31 года и старше – соотношение доли серопозитивных лиц мужского и женского пола выравнивается.

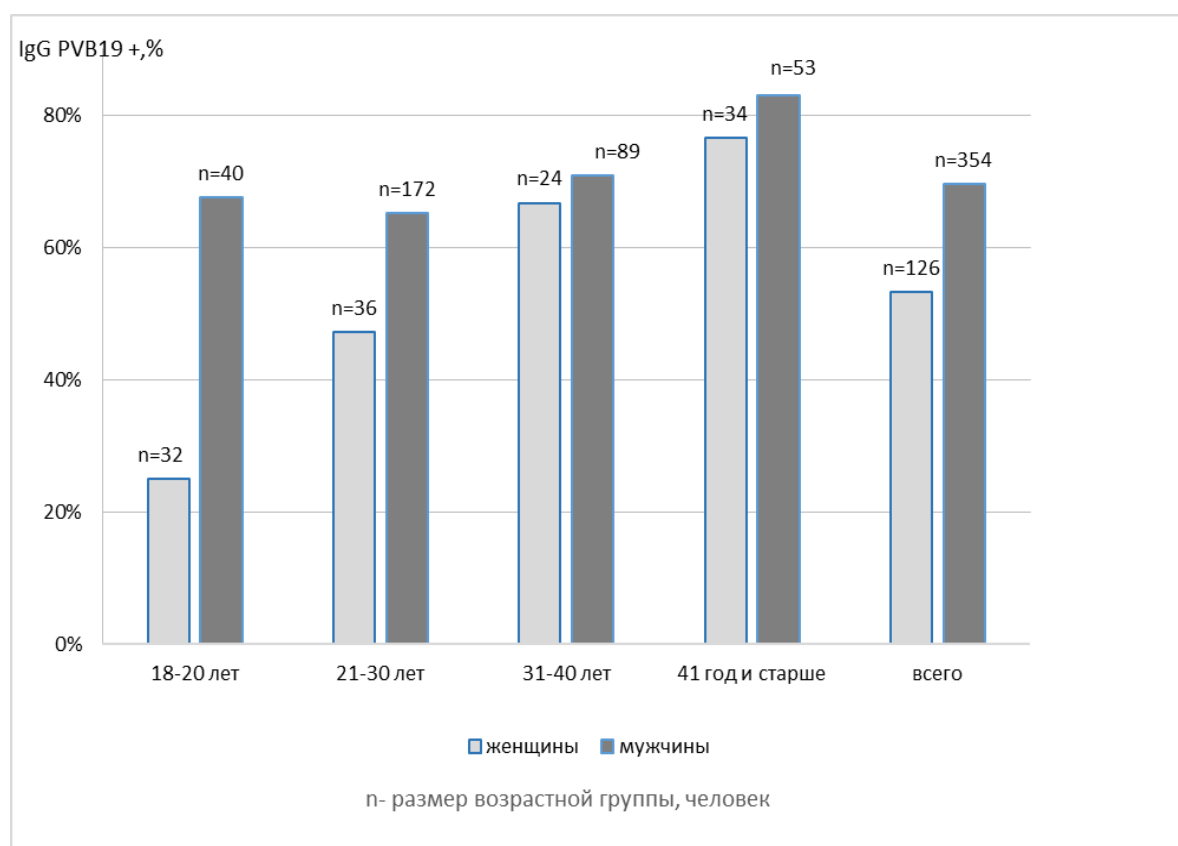


Рисунок 10 - Доля серопозитивных к PVB19 образцов условно здоровых жителей г. Нур-Султан в зависимости от пола и возраста

В 71 образце ($14,8 \pm 1,62\%$) была обнаружена ДНК РVВ19; положительные образцы выявлялись во всех возрастных группах (таблица 14).

Наибольшее число ДНК РVВ19-положительных образцов ($23,6 \pm 5,0\%$) получено в возрастной группе 18-20 лет. В группах 21-30 и 31-40 лет доля образцов, содержащих вирусную ДНК, снижается, составляя $14,4 \pm 2,44\%$ и $7,9 \pm 2,55\%$, соответственно. В старшей возрастной группе 41 год и старше отмечается вторая волна повышения доли ДНК РVВ19 положительных образцов – до $17,2 \pm 4,05\%$. Выявленные различия статистически достоверны ($df=3$, $\chi^2=9.059$, $p=0.029$).

Таблица 14 - Выявление ДНК РVВ19 в крови условно здоровых жителей г.Нур-Султан в разных возрастных группах

Возрастная группа (лет)	Количество исследованных образцов, абс	Из них ДНК + РVВ19	
		Количество, абс	Доля %, $M \pm m$,
18-20	72	17	$23,6 \pm 5,00$
21-30	208	30	$14,4 \pm 2,44$
31-40	113	9	$7,9 \pm 2,55$
41 и старше	87	15	$17,2 \pm 4,05$
Всего	480	71	$14,8 \pm 1,62$

Анализ величины вирусной нагрузки ДНК-положительных проб показал, что в абсолютном большинстве, а именно в 60 из 71 ($84,5 \pm 4,3\%$) вирусная нагрузка была невысокой: менее $1,0 \times 10^3$ МЕ/мл ДНК РVВ19 (таблица 15).

В целом, доля образцов с вирусной нагрузкой более 103МЕ/мл ДНК РVВ19 последовательно понижалась: содержание ДНК РVВ19 в количестве 103-104 МЕ/мл выявлено в 8,5% ($n=6$) образцов, вирусная В19 ДНК в количествах от 104 до 105МЕ/мл – в 7,0% ($n=5$). Образцов с более высокой вирусной нагрузкой (≥ 106 МЕ/мл) не выявлено.

Таблица 15 - Вирусная нагрузка (МЕ/мл) в образцах крови условно здоровых жителей г.Нур-Султан в зависимости от возраста

Возрастная группа	ДНК РVВ19+, абс.	<10 ³ ДНК РV В19	10 ³ ≤ ДНК РVВ19 < 10 ⁴	10 ⁴ ≤ ДНК РVВ19 < 10 ⁵
18-20	17	64,7%	11,8%	23,5%
21-30	30	86,7%	10,0%	3,3%
31 и старше	24	95,8%	4,2%	-
Всего	71	84,5%	8,5%	7,0%

В отличие от средних показателей, в возрастной группе 18-20 лет отмечалось повышение абсолютного числа и доли проб с более высокой концентрацией вирусной ДНК в диапазоне от 1000 до 100000 МЕ/мл. Образцы с вирусной нагрузкой от 10⁴ до 10⁵ МЕ/мл составили 23,5% (n=4), с вирусной нагрузкой 10³-10⁴ МЕ/мл – 11,8% (n=2). В этой же возрастной группе было зарегистрировано наибольшее число образцов (6 из 11) с концентрацией ДНК РVВ19 выше 1,0x10³ МЕ/мл.

Максимальный показатель вирусной нагрузки, равный 4,0x10⁴МЕ/мл, обнаружен в крови мужчины в возрасте 26 лет. В образцах крови лиц 31 года и старше концентрация ДНК РVВ19 была менее 10⁴ МЕ/мл.

Распределение ДНК-положительных образцов по гендерному признаку представлено на рисунке 11.

В целом у женщин ДНК парвовируса В19 в образцах крови выявлялась чаще, чем у мужчин – 19,1±3,5% и 13,3±1,8% от числа обследованных соответственно, хотя эти различия не достоверны (p=0.118). В то же время наблюдаются значительные различия в частоте выявления ДНК у мужчин и женщин в зависимости от возраста обследуемых. В возрастной группе 18-20 лет доля ПЦР-положительных проб у мужчин составляет 30% против 15,6% у женщин.

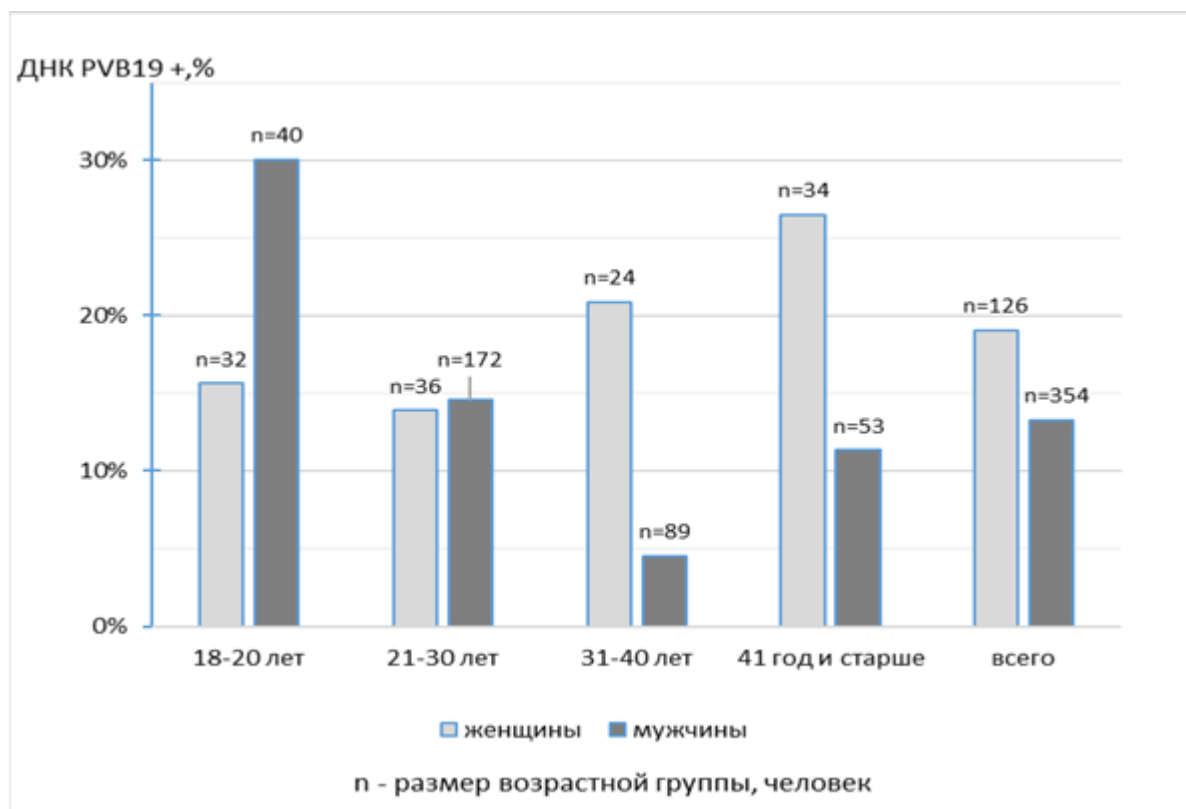


Рисунок 11 - Доля ДНК PVB19 положительных образцов в зависимости от пола и возраста жителей Республики Казахстан

В группе 21-30 лет ДНК PVB19 выявляется примерно с одинаковой частотой у мужчин и женщин. В возрастных группах 31-40 лет и 41 год и старше значительно преобладает доля ПЦР-положительных образцов, полученных от женщин: 20,8% и 26,5%, соответственно, против 4,5% и 11,3%, соответственно – у мужчин. В образцах с вирусной нагрузкой ДНК PVB19 выше $1,0 \times 10^3$ МЕ/мл отмечалась высокая концентрация IgG: в среднем содержание антител IgG составляет $85,4 \pm 13,42$ МЕ/мл (56,0-102,8 МЕ/мл). Напротив, в пробах с низкой вирусной нагрузкой концентрация IgG в среднем была ниже $51,1 \pm 28,17$ МЕ/мл (10,1-98,5 МЕ/мл).

Таким образом, формирование коллективного иммунитета к PVB19 у жителей г.Нур-Султан (Республика Казахстан) в целом коррелирует с аналогичными показателями, полученными при тестировании образцов крови условно здоровых жителей г.Санкт-Петербург (РФ). Совокупная доля серопозитивных лиц 18-30 лет составила около 50% в обеих популяциях,

превышая аналогичный показатель, полученный при исследовании образцов крови трудовых мигрантов из Республик Узбекистан и Таджикистан – $38,0 \pm 6,86\%$. Доля серопозитивных лиц старше 40 лет так же сопоставима: $72,5 \pm 3,61\%$ – в г. Санкт-Петербург и $80,5 \pm 4,25\%$ – в г. Нур-Султан.

3.4 Выявление маркеров ПВИ в образцах крови жителей Гвинеической Республики (Западная Африка)

Результаты, полученные в разделах 3.1-3.4 выявили особенности формирования коллективного иммунитета к PVB19 в странах Евразийского континента, связанных тесными взаимодействиями, миграционными потоками, торговыми, культурными и межличностными взаимодействиями. Представляло интерес изучить факторы, влияющие на формирование коллективного иммунитета на Африканском континенте, географически удаленном от стран Евразии и характеризующимся своими экономическими, социальными, этническими особенностями.

С этой целью на наличие маркеров ПВИ лабораторно исследованы 321 образец крови условно здоровых жителей Гвинеической Республики (таблица 16).

Таблица 16 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови условно здоровых жителей Гвинеической Республики в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс.)	Из них IgG «+» к PVB19	
		Количество (абс.)	Доля серопозитивных (%), $M \pm m$
18-20	18	8	$44,4 \pm 11,71$
21-30	78	42	$53,8 \pm 5,64$
18-30	96	50	$52,1 \pm 5,10$
31-40	88	47	$53,4 \pm 5,32$
41 и старше	137	76	$55,5 \pm 4,25$
Всего	321	173	$53,9 \pm 2,78$

Количество мужчин составляло 50,1%, женщин 49,9%. Образцы крови мужчин и женщин установленного возраста были получены от лиц 18 - 83 лет (средний возраст – 35,6 года, медиана – 32 года), проживающих в г. Конакри, г.Киндия, в провинциях Маму, Лабэ, Нзерекаре, Канкан, Фаранах, Боке. Образцы были распределены на 4 возрастные группы. Специфические IgG к PVB19 были выявлены в каждой из них. В целом доля Ig-положительных проб составила $53,9 \pm 2,78\%$ (173 из 321).

Наименьшая доля серопозитивных проб регистрировалась в группе 18-20 лет ($44,4 \pm 11,71\%$). Начиная с возрастной группы 21-30 лет, доля серопозитивных образцов увеличилась до $53,8 \pm 5,64\%$. Совокупно доля серопозитивных лиц от 18 до 30 лет составила $52,1 \pm 5,10\%$ и существенно не изменялась в старших возрастных группах.

Гендерный анализ (рисунок 12) показал, что доля серопозитивных лиц мужского пола в целом несколько выше, чем доля серопозитивных лиц женского пола – 57,4% против 47,9%.

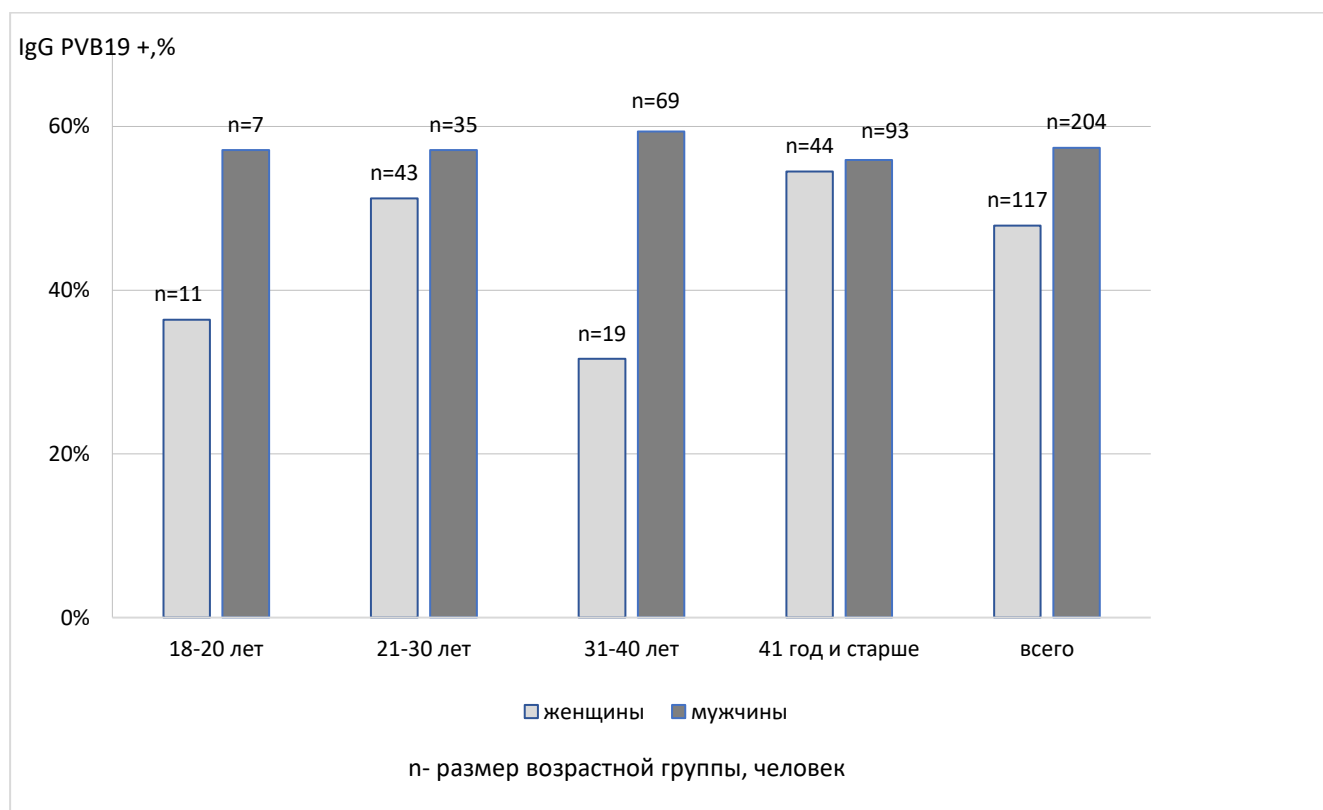


Рисунок 12 - Доля серопозитивных к PVB19 образцов крови условно здоровых жителей Гвинейской Республики в зависимости от пола и возраста

Однако в возрастных группах 18-20 лет и 31-40 лет выявлялись существенные различия между мужчинами и женщинами – 57,1% против 36,4% и 59,4% против 31,6%, соответственно. В группах 21-30 лет и 41 год и старше доля серопозитивных мужчин и женщин существенно не различались, находясь на уровнях 51,2 -57,1%.

В 40 из 558 образцов крови была обнаружена ДНК PVB19, что составило $7,2 \pm 1,09\%$. Распределение ДНК-положительных образцов по возрастным группам представлено в таблице 17.

Максимальная доля образцов, содержащих вирусную ДНК, а именно $10,9 \pm 4,59\%$, выявлена среди лиц 18-20 лет.

Таблица 17 - Выявление ДНК PVB19 в крови условно здоровых жителей Гвинеической республики в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество исследованных образцов (абс.)	Из них ДНК PVB19+	
		Количество (абс.)	Доля, %, $M \pm m$
18-20	46	5	$10,9 \pm 4,59$
21-30	193	19	$9,8 \pm 2,14$
31-40	147	5	$3,4 \pm 1,50$
41 и старше	172	11	$6,4 \pm 1,75$
Всего	558	40	$7,2 \pm 1,09$

Отмечалась тенденция к снижению доли ДНК-положительных проб до показателя $3,4 \pm 1,50\%$ в группе от 31 года до 40 лет. В последней возрастной группе (41 год и старше) доля ДНК-положительных образцов несущественно повышается, составляя $6,4 \pm 1,75\%$. В целом статистически достоверные различия отмечены только между 1 и 3 возрастными группами ($p=0.047$).

Гендерные различия в выявлении ДНК PVB19 в образцах крови условно здоровых лиц Гвинеической Республики представлены на рисунке 13.

ДНК РVВ19 +,%

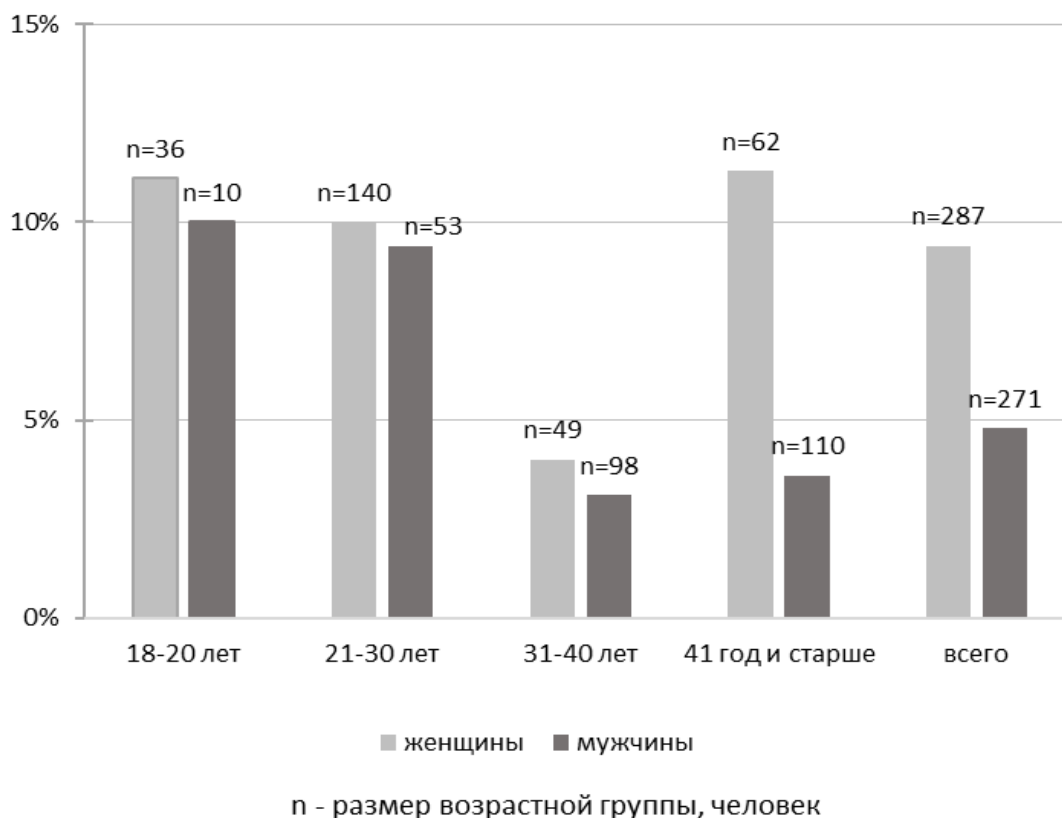


Рисунок 13 - Доля ДНК РVВ19 положительных образцов условно здоровых жителей Гвинеи в зависимости от пола и возраста

В целом доля женщин, в крови которых обнаруживалась ДНК парвовируса В19, выше, чем мужчин – 9,4% и 4,8% соответственно (статистически достоверно, $p=0.035$). Однако в старшей возрастной группе (41 год и старше) наблюдаются значительные различия в частоте выявления ДНК РVВ19 у мужчин и женщин – 3,6% и 11,3% соответственно ($p=0.049$). В остальных возрастных группах доля ПЦР-положительных проб выявляется примерно с одинаковой частотой у мужчин и женщин.

Таким образом, лабораторные маркеры парвовирусной инфекции были выявлены во всех обследованных когортах населения Евразийского континента и Гвинеи (Западная Африка). При этом наблюдается общая тенденция повышения уровня серопревалентности к РVВ19 в старших возрастных группах. Были выявлены гендерные различия в формировании коллективного

иммунитета к PVB19. Вместе с тем в каждой возрастной группе населения обследованных территорий были выявлены серонегативные лица.

Активная циркуляция вируса, а также наличие восприимчивых к заражению лиц могут привести к распространению инфекции в группах риска – среди беременных женщин, лиц с первичными и вторичными иммунодефицитами, больных анемиями, реципиентов крови и костного мозга, онкологических больных.

ГЛАВА 4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МАРКЕРОВ ПВИ В ГРУППАХ РИСКА

Как сообщалось, проявления ПВИ варьируют от асимптомного течения или легкого экзантемного заболевания (инфекционная эритема) до тяжелых форм (апластический криз, панцитопения, острый гепатит, фульминантная печеночная недостаточность, энцефалит, кардиомиопатия и миокардит). Тяжесть клинического течения зависит от гематологического и иммунологического статуса человека. В специальной литературе имеются отдельные сообщения о том, что парвовирусная инфекция может осложнять течение заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитами (онкологические, гематологические и др.) [20, 155, 163]. Однако исследований, посвященных распространению маркеров ПВИ у пациентов, страдающих хроническими инфекциями, паразитарными заболеваниями, среди больных онкогематологического профиля, особенно детского возраста, и влиянию коинфицирования парвовирусом В19 на тяжесть течения и прогноз основного заболевания – в целом недостаточно. Изучению этих вопросов посвящена данная глава настоящего исследования.

4.1 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у ВИЧ-инфицированных

Вирусные коинфекции у пациентов с ВИЧ-инфекцией, приводящие к изменению степени тяжести течения обоих заболеваний, являются важной проблемой здравоохранения. На маркеры ПВИ (IgG-антитела, ДНК РVВ19) были исследованы образцы плазмы крови пациентов с подтвержденной ВИЧ-инфекцией (n=231), полученные в 2016 году из «Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Санкт-Петербург.

В целом антитела IgG к РVВ19 были обнаружены в 183 (79,2±2,67%) случаях. У 76 пациентов возраст не был указан. В этой группе серопревалентность к РVВ19 составила 88,2±3,71%.

Среди лиц с указанием возраста (n=155) антитела IgG к PVB19 были обнаружены в 115 (74,8±3,49%) случаях. В возрастной группе 23-30 лет (n=24) серопревалентность составила 54,2±2,67%. У пациентов 31-40 лет (n=78) и 41-50 лет (n=40) специфические IgG к PVB19 выявлялись в 83,3±4,22% и 80,0±6,32% образцах соответственно. В возрастной группе 50 лет и старше (n=13) доля серопозитивных снижалась до 46,2±13,83%, что возможно связано угнетением гуморального иммунного ответа до неопределяемого уровня из-за нарушений иммунного ответа ВИЧ инфицированных пациентов (таблица 18).

Таблица 18 - Выявление специфических IgG к PVB19 в образцах крови ВИЧ инфицированных пациентов в разных возрастных группах

Возраст (лет)	Количество обследованных (абс)	Из них специфические IgG к PVB19+	
		Количество абс.чел.	Доля ДНК PVB19+ M±m, %
23-30	24	13	54,2±10,17
31-40	78	65	83,3±4,22
41-50	40	32	80,0±6,32
51 и старше	13	6	46,2±13,83
Всего	155	116	74,8±3,49

В целом ДНК PVB19 была обнаружена у 6 (2,6±1,05%) серопозитивных пациентов с ВИЧ-инфекцией: по два ДНК-положительных образца в возрастных группах 31-40 и 41-50 лет, а также в двух образцах плазмы лиц без указания возраста. Вирусная нагрузка во всех случаях составляла менее $2,3 \times 10^3$ МЕ/мл ДНК PVB19. Гематологические показатели ВИЧ-инфицированных пациентов с выявленной в плазме крови ДНК PVB19 представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Гематологические показатели ВИЧ-инфицированных пациентов, с выявленной ДНК PVB19

№ пациента	Возраст (лет)	Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	Количество лейкоцитов, $\times 10^9/л$	Количество тромбоцитов, $\times 10^9/л$	ДНК PVB19, МЕ /мл
110	31	2,8	4,2	165	2279
140	35	4,4	6,3	194	2276
26	неизв.	4,62	4,0	176	562
45	неизв.	3,75	8,0	202	253
225	42	3,6	4,5	190	218
89	48	4,3	6,4	221	154

Таким образом, несмотря на достаточно высокую серопревалентность к PVB19, выявленную в целом по группе ВИЧ-инфицированных лиц ($79,2 \pm 2,67\%$), около половины обследованных пациентов в возрасте до 30 лет, а также в возрасте 51 год и старше не имели защитных антител к PVB19. Такие пациенты находятся в группе риска по ПВИ. При этом у двух ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцированием PVB19 наблюдалась стойкая анемия, что позволяет предположить ее связь с ПВИ.

4.2 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у больных онкогематологического профиля

Данный фрагмент работы выполнен при участии специалистов «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой». Основная задача раздела – определение вирусной нагрузки PVB19 методом количественной ПЦР в реальном времени у пациентов до аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) и в ранние сроки после нее, а также проведение анализа связей с уровнями специфических антител у пациентов после алло-ТГСК.

Всего были обследованы 54 пациента, которым выполнялась алло-ТГСК, медиана возраста – 7,2 года (0,6 – 19 лет). Большинство больных (51 из 54) этой группы наблюдали в течение 2 месяцев после алло-ТГСК. Большую часть обследованной группы составляли больные с острым миелобластным лейкозом (n=20; 37%), острым лимфобластным лейкозом (n=14; 26%); тяжелыми анемиями различного генеза (15%; n=8). Треть пациентов (33%) находились в стадии ремиссии после ранее проведенного лечения (таблица 20).

Таблица 20 - Клиническая характеристика пациентов при алло-ТГСК

Диагноз	Значение %, (число пациентов)
Острый лейкоз всего	55,5% (30)
В том числе: Острый миелоидный лейкоз	30,0% (16)
Острый лимфобластный лейкоз	25,5% (14)
Хронический миелогенный лейкоз	1,8% (1)
Злокачественные лимфомы	3,6% (2)
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз	7,5% (4)
Нейробластома	3,6% (2)
Апластическая анемия, тяжелая степень	9,0% (5)
Анемия Фанкони	1,8% (1)
В-талассемия	1,8% (1)
Синдром Вискотта-Олдрича	1,8% (1)
Остеопетроз	1,8% (1)
Мукополисахаридоз 1 типа	11,0% (6)
Незлокачественные заболевания	28,0% (15)

Аллогенная трансплантация костного мозга выполнена в 83% случаев (49 из 54 больных), в остальных случаях проводили инфузию стволовых кроветворных клеток (СКК). Совместимые неродственные, родственные и гаплоидентичные трансплантации проводились в 44%, 20% и 35% соответственно. Кондиционирующая терапия, как правило, проводилась в немиелоаблативном

режиме. Обследование пациентов после алло-ТГСК проводилось согласно принятому клиническому протоколу. Лабораторные исследования включали клинические анализы крови, мочи, биохимию сыворотки и т.д. Определение ДНК парвовируса В19, герпесвирусов (CMV, EBV, HSV) и полиомавирусов (BK, JC) проводилось в период перед алло-ТГСК (0 суток), а также через 30 и 60 суток после трансплантации.

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

Сравнение средних уровней вирусной нагрузки ДНК PVB19 или концентрации IgG-антител к парвовирусу в течение 30-60 суток после интенсивной терапии и алло-ТГСК не показало достоверных изменений со временем (таблица 21). Но показана корреляция между этими лабораторными показателями и клиническими проявлениями у пациентов. В частности, ненулевые значения вирусной нагрузки отмечались у 28% до алло-ТГСК, 29% и 30,4% через 30 и 60 суток после алло-ТГСК соответственно, т.е. около 70% пациентов показали негативные результаты на протяжении периода после алло-ТГСК. Антитела IgM к PVB19 в образцах крови не обнаружены. До алло-ТГСК IgG к PVB19 выявлялись у 37 (68,5%), на Д+30 – у 41 (80,4%), на Д+60 – у 38 (77,6%) пациентов.

Таблица 21 - Средние и медианные значения уровней сывороточных IgG-антител и ДНК PVB19 в различные сроки наблюдения больных после алло-ТГСК

Исследованные параметры	IgG-антитела к парвовирусу В19 (МЕ/мл)		
	До алло-ТГСК	День +30	День +60
Сроки исследования	2	3	4
1	2	3	4
Число случаев	54	51	49
Средние значения	21,7	24,8	22,8
SE	3,7	3,4	3,6

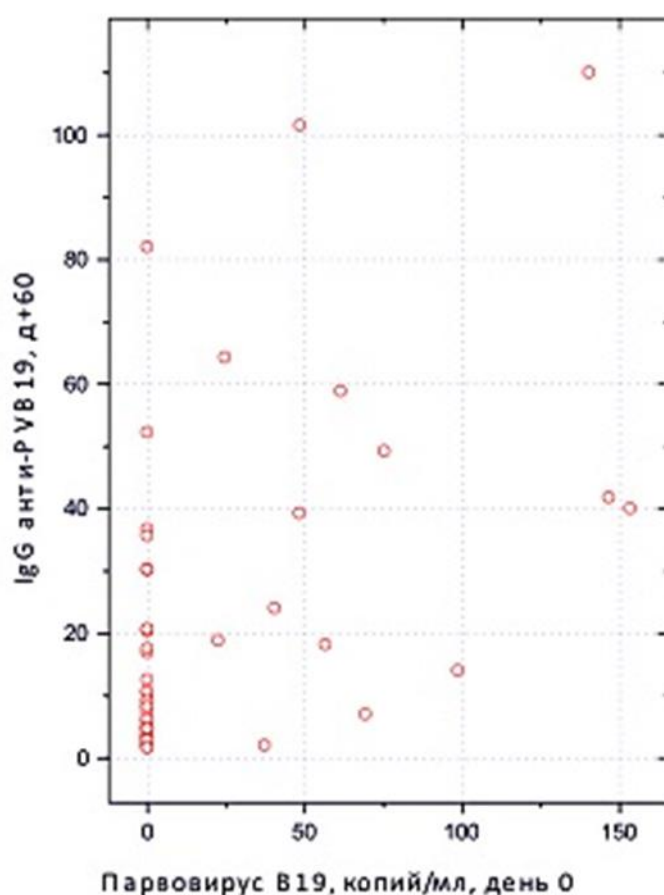
Продолжение таблицы 21

1	2	3	4
SD	26,9	24,1	25,4
Медиана	10,7	18,8	12,5
Минимум	0,0	1,6	1,5
Максимум	100,0	96,3	110,0
ДНК парвовируса В19, число копий/мл			
Сроки исследования	До алло-ТГСК	День +30	День +60
Число случаев	54	51	49
Средние значения	27,2	32,9	25,7
SE	6,7	9,7	6,8
SD	49,5	68,8	47,3
Медиана	0	0	0
Минимум	0	0	0
Максимум	178,3	280,9	222,2
Степень корреляции между исходной вирусной нагрузкой и уровнями IgG-антител к PVB19 в различные сроки после алло-ТГСК			
Сроки исследования	До алло-ТГСК	День +30	День +60
Коэффициент корреляции r	0,367	0,274	0,461
Уровень достоверности P	0,003	0,02	0,0004

Выявление ДНК PVB19 как до, так и после алло-ТГСК не сопровождалось детекцией IgM антител, что свидетельствует об отсутствии острого инфекционного процесса ПВИ на всех сроках наблюдения.

Достоверная положительная корреляция отмечена между вирусной нагрузкой и уровнями анти-PVB19 IgG по всем параметрам учета ($r=0.351$; $p=0.000008$, 153 больных, все точки), но максимальной она является в срок 60 суток после алло-ТГСК. Так, показана высокодостоверная корреляция между исходной вирусной нагрузкой (до алло-ТГСК) и уровнями IgG-антител к парвовирусу в разные сроки наблюдения (рисунок 14).

Отмечается достоверная зависимость между наличием ДНК PVB19 до алло-ТГСК и выраженной антительной реакцией через 60 суток после алло-ТГСК. Ненулевые значения вирусной нагрузки коррелируют с более высоким содержанием анти-PVB19 антител. Период полужизни изогенных антител класса IgG в организме человека составляет 1-4 недели [124]. Это свидетельствует о возможности продукции специфических антител клетками памяти после перенесенной цитостатической терапии, т.е. о возможном функционировании, например, плазматических клеток, способных вырабатывать специфические антитела в течение многих месяцев и лет. Либо о возможном бустер-эффекте при повторном инфицировании вирусом при переливании крови.



Важно отметить, что при повышенных уровнях IgG к парвовирусу B19 наблюдали нарушения приживления трансплантата, которые, в целом выявлялись чаще через 60 суток после алло-ТГСК ($r=0,315$; $p=0.034$; $n=46$).

Кроме того, показана достоверная корреляция между низким содержанием нейтрофилов и тромбоцитов (в меньше мере – эритроцитов) в крови больных и повышенными концентрациями вирусспецифических IgG-антител (рисунок 15а, б, с). Это может говорить о связи между продолжительной персистенцией парвовируса и замедленным восстановлением гемопоэза в сроки 30-60 суток после алло-ТГСК.

Аналогичные корреляции (менее выраженные) показаны также между исходным присутствием парвовируса и замедленным восстановлением эритроцитов и тромбоцитов в крови (соответственно $r=-0,281$; $p=0,02$; $r=-0,303$, $p=0,01$).

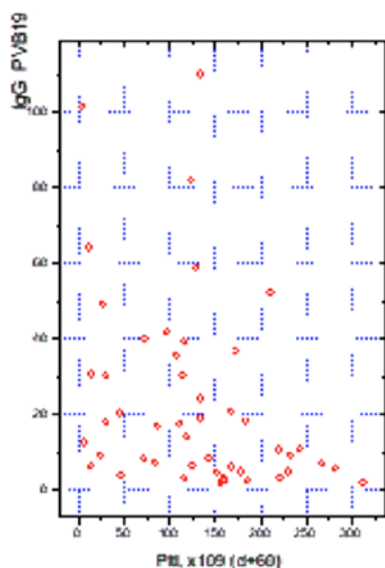


Рисунок 15.а

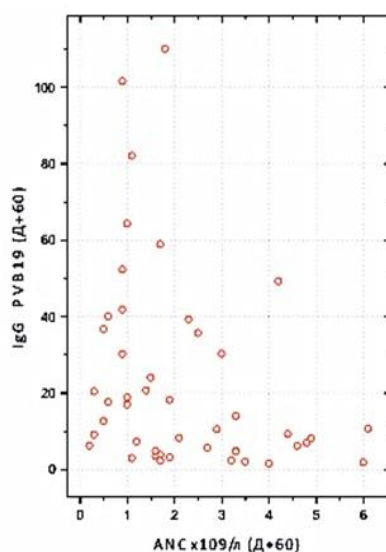


Рисунок 15.б

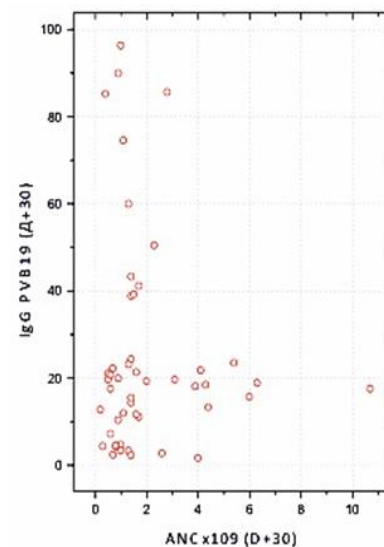


Рисунок 15.с

Рисунок 15 - Корреляция между гематологическими показателями и уровнем IgG PVB19 у пациентов после алло-ТГСК. 15.а. Зависимость числа тромбоцитов в крови на день +60 после алло-ТГСК и уровнями анти-PVB19 IgG в день +60 ($r=0.422$; $p=0.001$); 15.б. Отрицательная корреляция между содержанием числа нейтрофилов в крови на день +60 и уровнями анти-PVB19 IgG (день +60) ($r=-0.422$; $p=0.002$); 15.с. Зависимость уровня нейтрофилов в крови на день +30 от уровней анти-PVB19 IgG (день +30) ($r=-0.380$; $p=0.003$)

Наличие в крови вирусной В19 ДНК на 30 сутки после алло-ТГСК было ассоциировано с фебрильной нейтропенией в эти сроки – в 100% случаев (14/14), тогда как при отсутствии ДНК парвовируса фебрильная нейтропения отмечалась у 68% больных (23/34) ($p=0,016$; RR =1,478; 95% CI: 1,172 – 1,865). Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Различия в уровнях ДНК PVB19 у больных с фебрильной нейтропенией и без нее

	С фебрильной нейтропенией	Без фебрильной нейтропенией
Число пациентов	37	11
Среднее число копий PVB19	42,37	0
Среднее отклонение	77,01	0
Средняя ошибка	12,7	0

Таким образом, наличие ДНК парвовируса В19 в крови детей до трансплантации кроветворных клеток сопровождалось повышением уровня IgG-антител в крови на всех сроках наблюдения после нее и было ассоциировано с нейтро- и тромбопенией, наступающей после проведенной алло-ТГСК.

4.3 Выявление лабораторных маркеров ПВИ у больных малярией

По сведениям ряда авторов, инфицирование PVB19 может спровоцировать более тяжелое течение малярии [30, 54, 74, 181].

Малярия – трансмиссивное паразитарное заболевание, вызываемое простейшими рода *Plasmodium*, широко распространенное в странах Экваториальной Африки, Юго-Восточной Азии, Океании, Центральной и Южной Америки. Проблема особенно актуальна для африканского континента к югу от Сахары. На эту территорию приходится 90% случаев заболевания и 92% случаев

смерти от малярии в мире. По данным ВОЗ, в Гвинейской Республике в 2017 г. было зарегистрировано 1,57 миллиона подтвержденных случаев малярии [234].

Заболевание протекает циклически, с лихорадочными пароксизмами, гепатолиенальным и анемическим синдромом. Тяжелыми осложнениями малярии, приводящими к летальным исходам, могут быть церебральная (малярийная) кома, разрыв селезенки, отек мозга, острая почечная недостаточность, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром), острый массивный гемолиз, гемоглобинурия, геморрагический синдром.

Ниже представлены результаты изучения влияния инфицирования парвовирусом В19 на клиническое течение малярии и исход основного заболевания.

В период 2016-2018 гг. на наличие ДНК РVВ19 исследованы образцы плазмы крови 316 больных госпиталя префектуры Фрия Гвинейской Республики с лабораторно подтвержденным диагнозом «малярия».

Клиническое течение малярии у 316 обследованных пациентов оценивали как «неосложненное» и «осложненное». Неосложненное течение малярии выявлено у 177 (56,0±2,79%) пациентов. Эта форма заболевания характеризовалась лихорадкой, не превышающей 38-39°C, общей слабостью, умеренной анемией (концентрация гемоглобина более 70 г/л).

У 139 (44,0±2,79%) человек течение малярии было осложненным и сопровождалось подъемом температуры до 38-40°C, тошнотой, рвотой, тяжелой анемией (концентрация гемоглобина менее 70 г/л), высокими уровнями трансаминаз, креатинина, снижением общего белка в крови. В 8 (2,5±0,88%) случаях тяжелое течение болезни привело к летальному исходу.

Плазма крови больных неосложненной и осложненной формами малярии была исследована на наличие ДНК РVВ19. Полученные результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Влияние инфицирования PVB19 на течение малярии у больных префектуры Фрия (Гвинейская Республика)

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

В целом ДНК PVB19 была обнаружена в плазме крови у 55 из 316 больных (17,4±2,13%). Как в первой (ДНК PVB19 +), так и во второй (ДНК PVB19 -) группе пациентов отмечались случаи неосложненного и осложненного течения малярии и случаи смерти. Однако в группе с коинфицированием PVB19 и *P.falciparum* показатели осложнений и смертности оказались существенно выше и наблюдались у 40 из 55 (72,7±2,75%) пациентов, причем в 6 случаях (10,9±4,40%) заболевание закончилось смертью. В группе больных малярией без ПВИ осложнения имели место у 99 из 261 больного (37,9±3,0%); из них умерло 2 (0,8±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).

При изучении возрастного распределения 315 больных малярией с сочетанной парвовирусной инфекцией (таблица 23), установлено, что наиболее многочисленной является группа детей до 5 лет (медиана – 3 года); она составляет 89 (28,3±2,53%) человек. Наименьшее число заражений малярией приходится на возрастную группу 46-65 лет (медиана – 57 лет) – это 17 случаев, что составляет 5,4±0,71%. Примечательно, что ДНК PVB19 в плазме крови больных этой группы не обнаружена.

Таблица 23 - Распределение больных малярией с сочетанной парвовирусной инфекцией по возрастным группам

Возрастные группы (лет)	Количество пациентов абс / %, М±m	из них ДНК PVB19+ абс / % от возрастной группы, М±m
0 - 5	89 / 28,3 ± 2,53	16 / 18,0 ± 4,07
6 - 10	52 / 16,5 ± 2,09	15 / 28,9 ± 6,28
11 - 15	35 / 11,1 ± 1,77	12 / 34,3 ± 8,02
16 - 25	52 / 16,5 ± 2,09	8 / 15,4 ± 5,00
26 - 45	70 / 22,2 ± 1,16	4 / 5,7 ± 3,22
46 - 65	17 / 5,4 ± 0,71	0 / 0,0
Всего	315 / 100	55 / 17,5 ± 2,14

В других группах пациентов, больных малярией, наличие в плазме крови ДНК PVB19 характеризуется следующей динамикой: среди детей до 5 лет (медиана – 3 года) выявляется с частотой 18,0±4,07%; в группе 6-10 лет (медиана – 8 лет) частота выявления возрастает до 28,9±6,28, в группе 11-15 лет (медиана – 13 лет) достигает до максимального показателя – 34,3±8,02%. Показатель последовательно снижается до 15,4±5,0% в группе 16-25 лет (медиана – 20 лет), до 5,7±3,22% – в группе 26-45 лет (медиана – 36,5 лет) и отсутствует в возрастной группе 46-65 лет (медиана – 57 лет).

Максимальное число случаев осложненного течения малярии при ПВИ (n=15) приходится на больных до 5 лет и составляет 93,8±6,05% в данной возрастной группе и 27,3±7,04% от группы всех ДНК PVB19+ больных (таблица 24). Вероятность развития осложненного течения малярии при сочетанной инфекции в данной возрастной группе достоверно выше, чем при отсутствии ПВИ (p=0,0001; RR =2,44; 95% CI: 1,780–3,357).

Важно отметить, что на эту же группу приходится 6 из 8 случаев смерти, то есть, риск, летального исхода достоверно выше, чем при отсутствии инфицирования PVB19 (p=0,0003; RR =13,688; 95% CI: 3,034 - 61,740).

Таблица 24 - Распределение неосложненного и осложненного течения малярии с сочетанной парвовирусной инфекцией в разных возрастных группах

Возрастные группы	Неосложненное абс / % M±m	Осложненное абс / % M±m
0 - 5 лет	1 / 1,8 ± 1,80%	15 / 27,3 ± 7,04%
6 - 10 лет	5 / 9,1 ± 3,88%	10 / 18,2 ± 5,75%
11 - 15 лет	4 / 7,3 ± 3,50%	8 / 14,6 ± 5,14%
16 - 25 лет	3 / 5,5 ± 3,06%	5 / 9,1 ± 4,07%
26 - 45 лет	2 / 3,6 ± 2,52%	2 / 3,6 ± 2,57%
46 - 65 лет	0 / 0,0%	0 / 0,0%
Всего 55 человек	15 / 27,3 ± 6,01%	40 / 72,7 ± 11,50%

С возрастом частота осложненного течения малярии на фоне ПВИ снижается, хотя тенденция сохраняется у лиц до 26 лет. Так, среди пациентов 6-10 лет осложненное течение малярии регистрировалось у 18,2±5,75% инфицированных PVB19; в группе 11-15 лет – в 14,6±5,14% случаев; у лиц от 16 до 25 лет – в 9,1±4,07% случаев. Однако частота различий течения малярии между больными, инфицированными и не инфицированными парвовирусом В19, в возрастных группах от 6 до 25 лет статистически недостоверна.

4.4 Скрининговое лабораторное обследование пациентов из групп риска на маркеры ПВИ

Исходя из полученных результатов и на основании имеющихся в специальной литературе данных, предлагаются следующие алгоритмы лабораторного обследования пациентов из групп риска:

4.4.1 Алгоритм скринингового обследования ВИЧ-инфицированных пациентов на маркеры ПВИ

Для оценки риска инфицирования PVB19 пациентам с ВИЧ-инфекцией рекомендуется использовать серологические методы определения специфических

иммуноглобулинов IgG к PVB19 в сыворотке/плазме крови согласно разработанному алгоритму (рисунок 16).

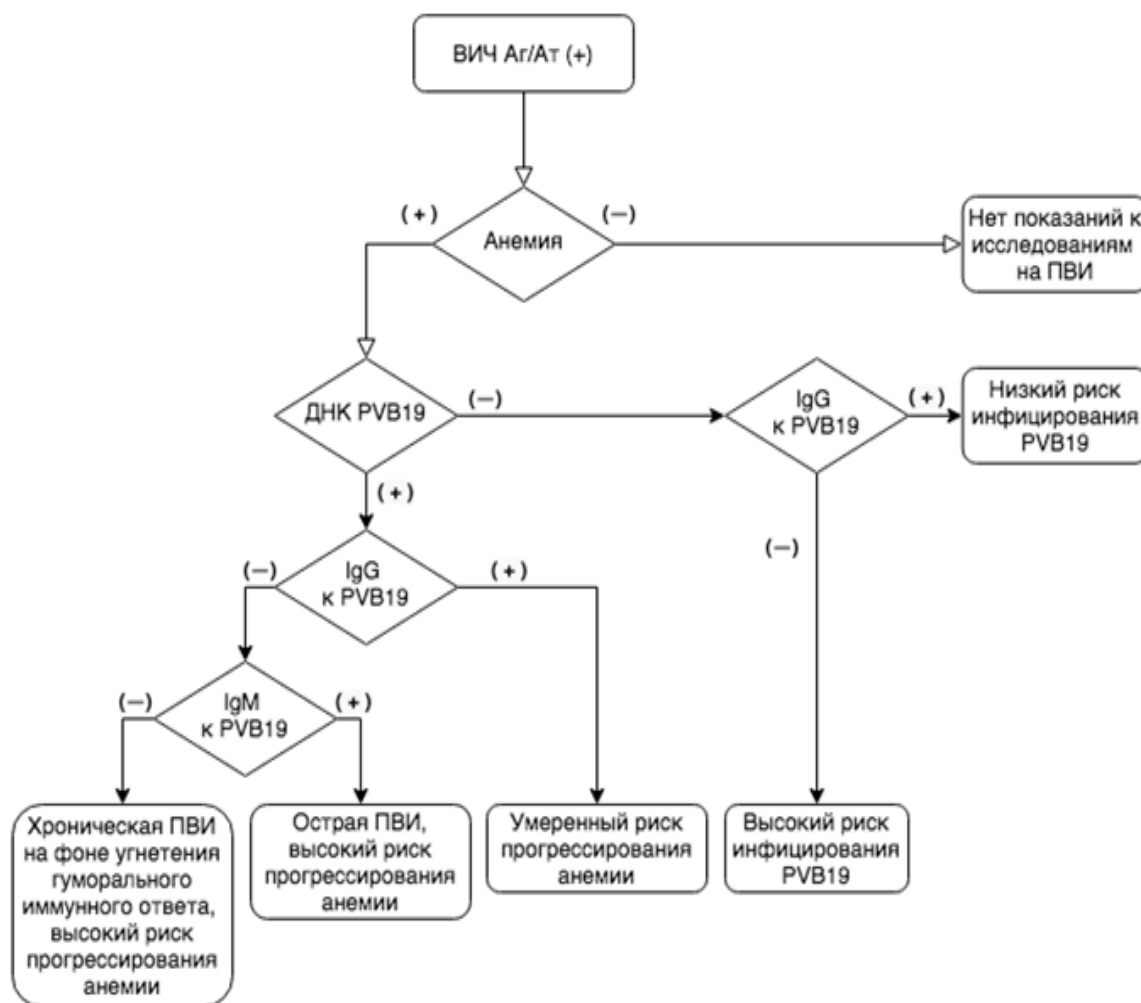


Рисунок 16 - Схема обследования ВИЧ-инфицированных пациентов на маркеры ПВИ

В случаях хронической (стойкой) анемии у пациентов с ВИЧ-инфекцией рекомендуется определение ДНК PVB19 в крови методом ПЦР и определение специфических IgG к PVB19 методом ИФА. Если, как ДНК PVB19, так и специфические IgG к PVB19 не выявлены, то этиологическим агентом анемии парвовирус В19 не является, но при этом сохраняется высокий риск инфицирования PVB19. Отсутствие ДНК PVB19 и наличие иммуноглобулинов класса G также свидетельствует о том, что анемия пациента не связана с инфицированием парвовирусом В19, при этом риск заражения расценивается как низкий.

В случае обнаружения ДНК PVB19 и отсутствия специфических IgG к PVB19, рекомендуется провести исследование на маркер острой ПВИ – IgM к PVB19. В случае обнаружения IgM PVB19 речь идет о недавнем инфицировании и острой инфекции, а также о высоком риске прогрессирования анемии. Отсутствие IgM к PVB19 может свидетельствовать о хронической ПВИ на фоне угнетения гуморального иммунного ответа до неопределяемого уровня из-за нарушений иммунного ответа ВИЧ-инфицированных пациентов. Что также влечет высокий риск прогрессирования анемии и утяжеления основного заболевания.

Обнаружение ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 позволяет говорить о хронической ПВИ и о возможной роли парвовируса в угнетении кроветворения и развитии анемии.

4.4.2 Алгоритм скринингового обследования пациентов онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК, на маркеры ПВИ

Для данной категории пациентов рекомендуется определять маркеры ПВИ до проведения алло-ТГСК и через 30/60 дней после алло-ТГСК. Рекомендуется определение парвовирусной ДНК в крови методом ПЦР и количественное определение специфических IgG к PVB19 методом ИФА (рисунок 17).

Отсутствие ДНК PVB19 и отсутствие специфических IgG к PVB19 как до трансплантации, так и после нее, расценивается как повышенный риск инфицирования парвовирусом B19 и требует наблюдения в динамике. В случае отсутствия ДНК PVB19 и наличия специфических IgG к PVB19 риск инфицирования снижается.

В случае обнаружения ДНК PVB19 и отсутствия IgG к PVB19 рекомендуется исследование на маркер острой ПВИ – IgM к PVB19 для подтверждения острой ПВИ. В случае обнаружения IgM к PVB19 речь идет о недавнем инфицировании и острой инфекции, риск возникновения осложнений высокий.

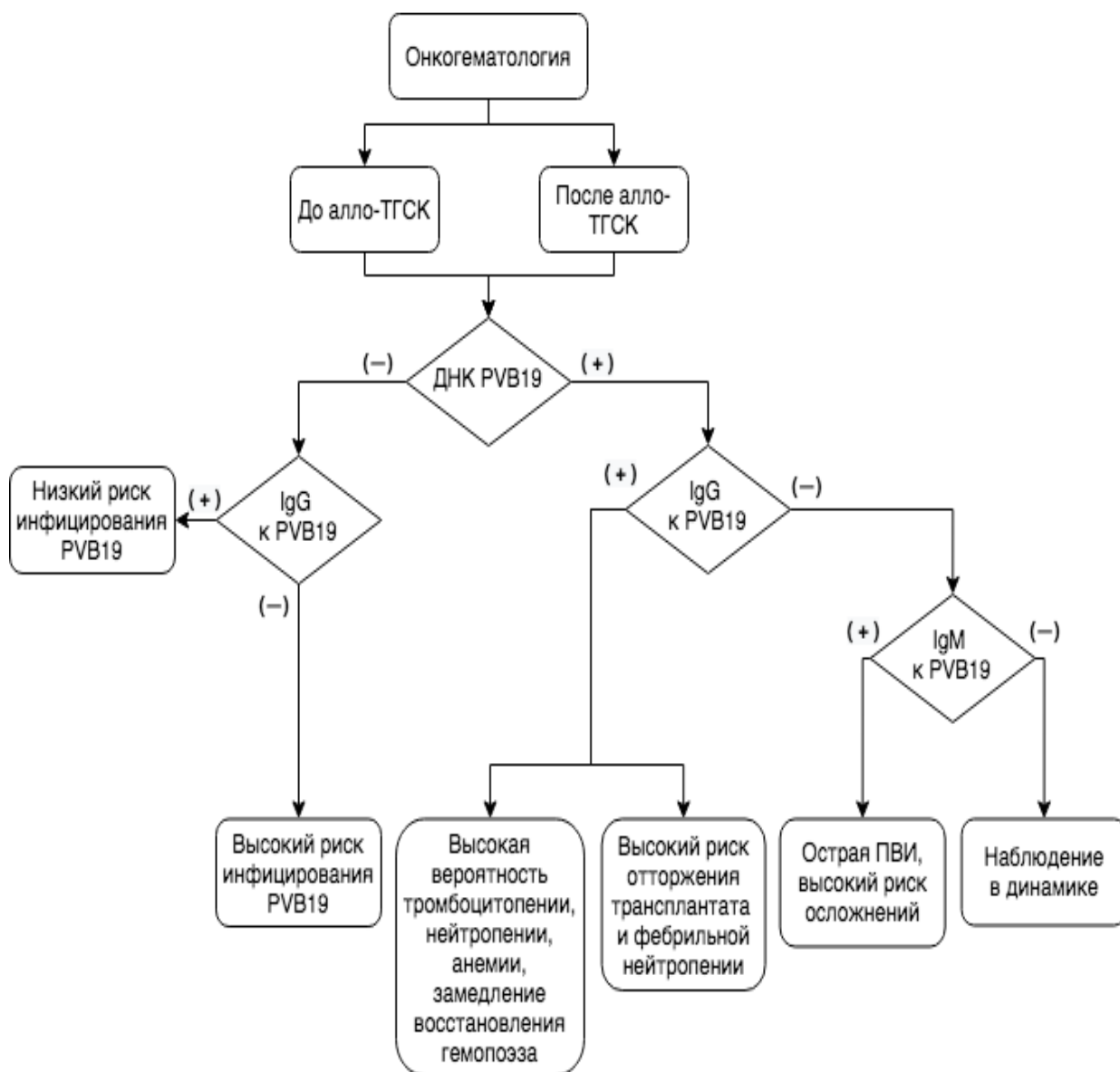


Рисунок 17 - Схема обследования больных онкогематологического профиля, которым показана алло-ТГСК, на маркеры ПВИ

При обнаружении ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 выше 20 МЕ/мл до трансплантации можно говорить о хронической ПВИ, при этом имеется высокий риск нарушения приживления трансплантата, развития нейтропении и тромбоцитопении, замедления восстановления эритроцитов и тромбоцитов после алло-ТГСК. Обнаружение ДНК PVB19 и специфических IgG к PVB19 выше 20 МЕ/мл после алло-ТГСК свидетельствует о продолжительной персистенции парвовируса, при этом сохраняется высокий риск развития фебрильной нейтропении.

4.4.3 Алгоритм скринингового обследования больных с хронической анемией (паразитарной этиологии) на маркеры ПВИ

Для оценки риска возникновения осложненного течения основного заболевания (паразитарная инфекция малярийным плазмодием), сопровождающегося хронической анемией, рекомендуется определять ДНК PVB19 в крови больного методом ПЦР и IgG к PVB19. Степень риска развития тяжелого клинического течения болезни зависит от возраста больного, который рекомендуется оценивать в трех возрастных группах: дети до 5 лет, дети и подростки 6-15 лет и возрастная группа 16 лет и старше (Рисунок 18).

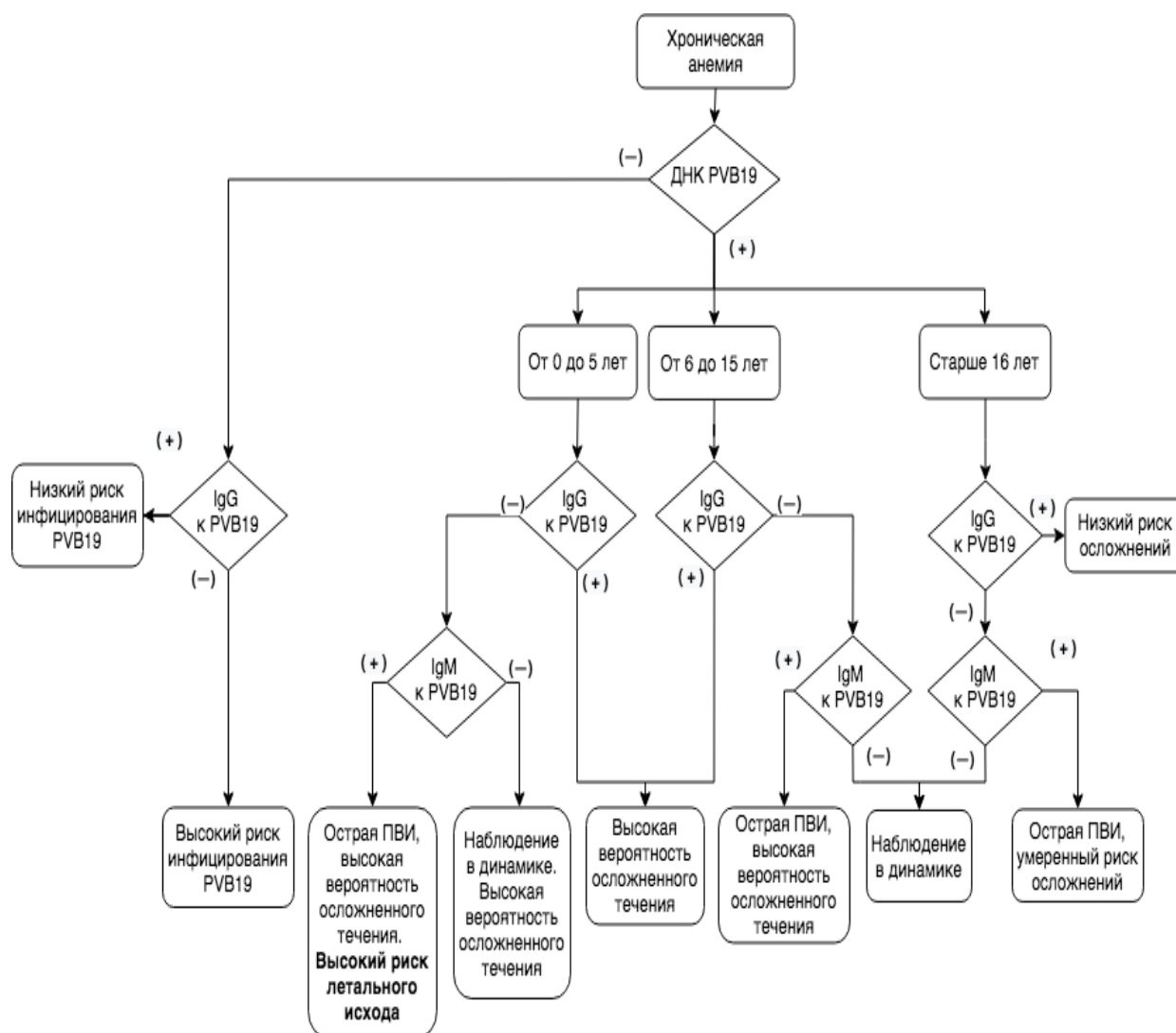


Рисунок 18 - Схема обследования больных с хронической анемией (паразитарной этиологии) на маркеры ПВИ

Случаи отсутствия ДНК PVB19 и отсутствия антител IgG к PVB19 в крови больного расцениваются как высокий риск инфицирования парвовирусом B19. При отсутствии ДНК PVB19 и обнаружении специфических антител IgG к парвовирусу пациент имеет иммунитет, риск инфицирования низкий.

Обнаружение ДНК парвовируса в крови больного малярией при отсутствии специфических антител IgG к парвовирусу может свидетельствовать о недавнем инфицировании (инкубационный период, стадия виремии). Для подтверждения острой инфекции рекомендуется определять специфические IgM. Риск возникновения осложнений (временная аплазия эритроцитарного ростка, снижение количества эритроцитов) высокий. Если специфические IgM не обнаружены, рекомендуется наблюдение в динамике.

Для возрастной группы до 5 лет наличие ДНК в крови детей как при отсутствии, так и при обнаружении специфических антител к PVB19 расценивается как высокий риск осложнённого течения малярии с угрозой летального исхода. Для детей и подростков 6-15 лет риск утяжеления состояния, прогрессирования анемии также высок, но риск летального исхода значительно снижается. В старшей возрастной группе 16 лет и старше при виремии в крови и обнаружении специфических антител класса G к PVB19 существует низкий риск возникновения осложнений.

Таким образом, установлено, что лабораторные маркеры ПВИ широко распространены у больных с вторичными иммунодефицитами, обусловленными вирусными и паразитарными заболеваниями, у пациентов онкогематологического профиля.

ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ PVV19

5.1 Разработка способа выявления в биологическом материале ДНК парвовируса V19 на основе двухэтапной ПЦР

Прямое секвенирование нуклеотидной последовательности является золотым стандартом для классификации генотипов и субтипов парвовируса V19, однако используемые для выявления вируса методики на основе технологии ПЦР недостаточно чувствительны для выявления вируса при низких концентрациях и/или основаны на выявлении коротких консервативных фрагментов нуклеотидных последовательностей, что не позволяет осуществлять глубокое типирование вируса. Учитывая, что среди ДНК-положительных к парвовирусу V19 проб, полученных в предыдущих разделах исследования, имелись образцы плазмы с невысокой вирусной нагрузкой, одной из задач настоящей работы стала разработка метода детекции ДНК PVV19 в низкокопийных образцах плазмы.

Известен метод выявления парвовируса V19 с оценкой вирусной нагрузки, основанный на полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией, представленный, например, в коммерческом наборе "АмплиСенс® Parvovirus V19-FL" (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из плазмы крови совместно с ВКО и проведении амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (формат FRT). Данный метод позволяет выявить вирус при концентрациях от 720 МЕ/мл и выше, линейный диапазон измерения набора реагентов 720 – 9000000 МЕ/мл.

Полученные в ходе амплификации фрагменты невозможно использовать для секвенирования и дальнейшего глубокого типирования вируса в связи с их небольшой протяженностью. Таким образом, данный метод не позволяет определить генотипы, выявить субтипы вируса и не может быть использован в случае низкой вирусной нагрузке.

Для повышения чувствительности метода и генотипирования образцов с низкой вирусной нагрузкой был разработан метод, в котором на первом этапе проводится амплификация ДНК методом асимметричной полимеразной цепной реакции с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных изолятов парвовируса В19. Для повышения чувствительности проводится вторая полимеразная цепная реакция с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних (вложенных, гнездовых) праймеров. При этом состав реакционного буфера изменяется на разных этапах. На первом этапе используется асимметричная ПЦР с протяженными праймерами (прямой праймер 5'-agccatttaagtgtttactataatatttattggtcagttt-3', обратный праймер 5'-tgttggtcatatctggtaataacttaattc-3'), на втором этапе используются праймеры к областям генома парвовируса В19. В составе амплификационной смеси на каждом этапе неравномерное соотношение дезоксирибонуклеозидтрифосфатов со сниженной концентрацией и высокая концентрация $MgCl_2$. На первом этапе в смеси присутствует глицерин в количестве 5% от конечного объема. На втором этапе формамид и DMSO в количестве 4% и 8% от конечного объема соответственно.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации парвовируса В19. Вирусную нагрузку предварительно измеряли с помощью стандартизованного набора для количественного определения ДНК В19 в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Parvovirus В19-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без парвовируса В19 (чистой плазмой) следующим образом: аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл чистой плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и

100 мкл нового пула переносили в третью пробирку и т.д. до десятикратного последовательного разведения (таблица 25).

Таблица 25 - Выявление парвовируса В19 в пулах

Образец	Без разведения	пул 1	пул 2	пул 3	пул 4	пул 5	пул 6	пул 7	пул 8	пул 9
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-

После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Полученные образцы ДНК амплифицировали согласно предложенному методу. Результаты выявления вируса в пулах разведения представлены в таблице 26.

Таблица 26 - Вирусная нагрузка использованных в оценке аналитической чувствительности образцов в разведениях.

Образец	Вирусная нагрузка образца	Вирусная нагрузка пул 1	Вирусная нагрузка пул 2	Вирусная нагрузка пул 3	Вирусная нагрузка пул 4	Вирусная нагрузка пул 5	Вирусная нагрузка пул 6	Вирусная нагрузка пул 7	Вирусная нагрузка пул 8	Вирусная нагрузка пул 9
1	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	<u>$1,5 \cdot 10^6$</u>	$5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^3$
2	$27 \cdot 10^5$	$13 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	<u>$8,8 \cdot 10^4$</u>	$4,2 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
3	$17 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$
4	$59 \cdot 10^4$	$29,5 \cdot 10^4$	<u>$14 \cdot 10^4$</u>	<u>$6,8 \cdot 10^4$</u>	$3,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
5	$56 \cdot 10^4$	$28 \cdot 10^4$	$14 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	<u>$1,7 \cdot 10^4$</u>	<u>$4 \cdot 10^3$</u>	$2,1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^2$
6	$33 \cdot 10^4$	$16,5 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^2$
7	$82 \cdot 10^3$	$41 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$	<u>$10 \cdot 10^3$</u>	$5,1 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	<u>$1,7 \cdot 10^3$</u>	$6,4 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$
8	$13 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	<u>$8,1 \cdot 10^2$</u>	<u>$4,7 \cdot 10^2$</u>	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	50	25
9	$3 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^2$	$3,7 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$	93	46	23	11	5
10	$8 \cdot 10^2$	<u>$4,2 \cdot 10^2$</u>	<u>$2 \cdot 10^2$</u>	100	50	25	12	6	3	1,5

Примечание: Вирусная нагрузка в пулах анализировалась выборочно (выделено полужирным шрифтом и подчеркиванием)

На рисунке 19 представлена фотография электрофореза продуктов амплификации второго этапа (праймеры 5'-СААТТГТСАСАСАСАСАССАГТА-3', 5'-АСТТАГССАГТТГГСТАТАССТ-3') последовательных разведений образца №8, вирусная нагрузка $13 \cdot 10^3$ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения (предположительно около 25 МЕ/мл) в достаточной концентрации для проведения секвенирующей реакции и получения нуклеотидной последовательности искомого фрагмента генома.

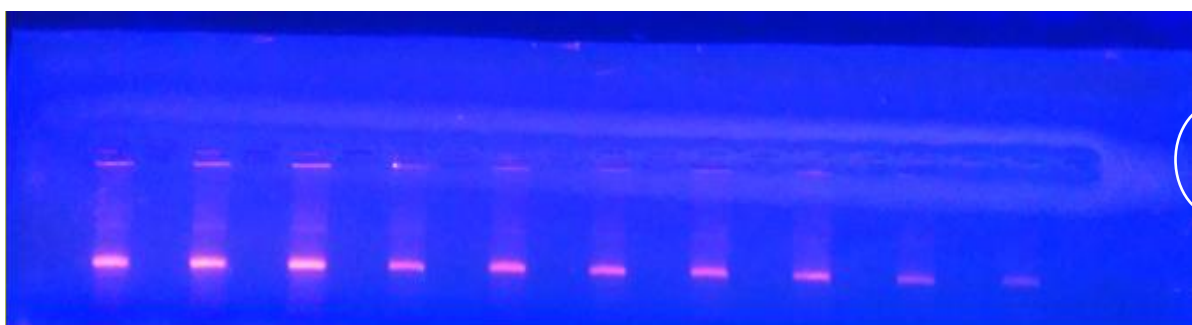


Рисунок 19 - Фотография электрофореза продуктов амплификации второго этапа последовательных разведений образца №8, вирусная нагрузка $13 \cdot 10^3$ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения предположительно около 25 МЕ/мл

Для определения специфичности разработанного метода в соответствии с отработанными условиями проведения ПЦР были исследованы предварительно охарактеризованные с использованием коммерческих тест-систем (ИФА, ПЦР) негативные по парвовирусу В19 образцы плазмы крови условно здоровых людей, экзантемных больных (IgM PVB19-), детей с алло-ТГСК и ВИЧ-инфицированных пациентов.

Оценку специфичности проводили в два этапа. На первом этапе последовательно проводили анализ охарактеризованных образцов. На втором этапе проводили «слепое» тестирование, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими PVB19-позитивную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК PVB19 в крови при низкой вирусной нагрузке представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК РVВ19 в крови при низкой вирусной нагрузке

Наименование группы образцов	Количество образцов	Положительные	Отрицательные	Сомнительные
Плазма условно здоровых (Республика Казахстан)	75	2	73	0
Плазма условно здоровых (Трудовые мигранты)	25	0	25	0
Плазма крови экзантемных больных (IgM РVВ19 -)	83	0	83	0
Плазма крови детей с алло-ТГСК	37	0	37	0
Плазма крови ВИЧ инфицированных	54	1	53	0
Всего	274	3	271	0

Из представленных данных видно, что 98,9% обследованных образцов являлись отрицательными, сомнительных образцов не обнаружено, три образца (1,1%) положительны при использовании указанного метода выявления РVВ19. Для позитивных образцов проводили секвенирование и генотипирование полученных фрагментов ДНК.

Дополнительно для оценки специфичности был проведен анализ образцов, представляющих собой пулированную плазму, содержащую в различных концентрациях вирусы гепатитов А, В, С, D, ВИЧ-1. Также смешивали нуклеиновые кислоты, экстрагированные из вышеуказанных образцов, до и после обратной транскрипции (для РНК-содержащих вирусов), после чего проводили анализ на выявление ДНК РVВ19 из полученных смесей. Ни в одном из образцов не было выявлено ДНК РVВ19. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о специфичности разработанного метода при исследовании биологического материала.

Способ, основанный на проведении двухэтапной ПЦР, разработан для выявления ДНК парвовируса В19 из образцов плазмы с низкой вирусной нагрузкой.

5.2 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови жителей г. Санкт-Петербург и Ленинградской области

Для выделения изолятов, циркулирующих на территориях РФ, было исследовано 9 образцов крови условно здоровых лиц разного возраста, вне зависимости от пола, проживающих в г. Санкт-Петербург и Ленинградской области. Генетические последовательности депонированы в международную базу данных Gene Bank под номерами: MH534950, MH166338, MG779501, MG779500, MG711455, MF481196, MF408298, MF405142, MT543168. Все проанализированные образцы относились к генотипу 1 субтипа 1А. Для выявления филогенетических связей использовали 7 изолятов PVB19. Эти нуклеотидные последовательности можно разделить на две подгруппы: 6 изолятов (85,7%) относились к подгруппе 1А2, один изолят (14,3%) к подгруппе 1А1. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рисунке 20.

Последовательности, полученные в этом исследовании, тесно связаны с обнаруженными ранее в 2010-2011 гг. на территории СЗФО; и в 2005-2011 гг. на территории Российской Федерации в работах других исследовательских групп. Эти данные свидетельствуют о продолжающейся вирусной циркуляции. Однако некоторый уровень кластеризации вирусов по годам может указывать на повторные вирусные ввозы или обновляющийся резервуар патогена.

5.3 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови условно здоровых жителей г. Нур-Султан

Для генетической характеристики были выбраны 12 изолятов, выделенных из образцов крови условно здоровых лиц вне зависимости от пола и возраста, проживающих в г. Нур-Султан (Республика Казахстан). Генетические последовательности депонированы в международную базу данных Gene Bank под номерами: MN427876, MN150057, МК929648, МК929647, МК848594, МК761201, МК642628, MN150059, MN150058, МТ543169, МТ543170, MN814845. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рисунке 21.

При филогенетическом анализе было показано, что все проанализированные изоляты также принадлежат к генотипу 1А. При этом 11 изолятов (91,7%) отнесены к подгруппе 1А1, 1 изолят (8,3%) к подгруппе 1А2. Образцы подгруппы 1А1, 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 $99,3 \pm 0,21\%$ и отличались от представленных в международной базе Gene Bank образцов. Особое внимание обращает на себя кластер, включающий изоляты MN150059, МК929648, MN150057, МК848594. Отсутствие высокого сходства нуклеотидных последовательностей с представленными в международной базе Gene Bank образцами в указанном кластере и тесной связи внутри кластера, с высокой долей вероятности, свидетельствует о независимой эндемичной циркуляции вируса в данном регионе.

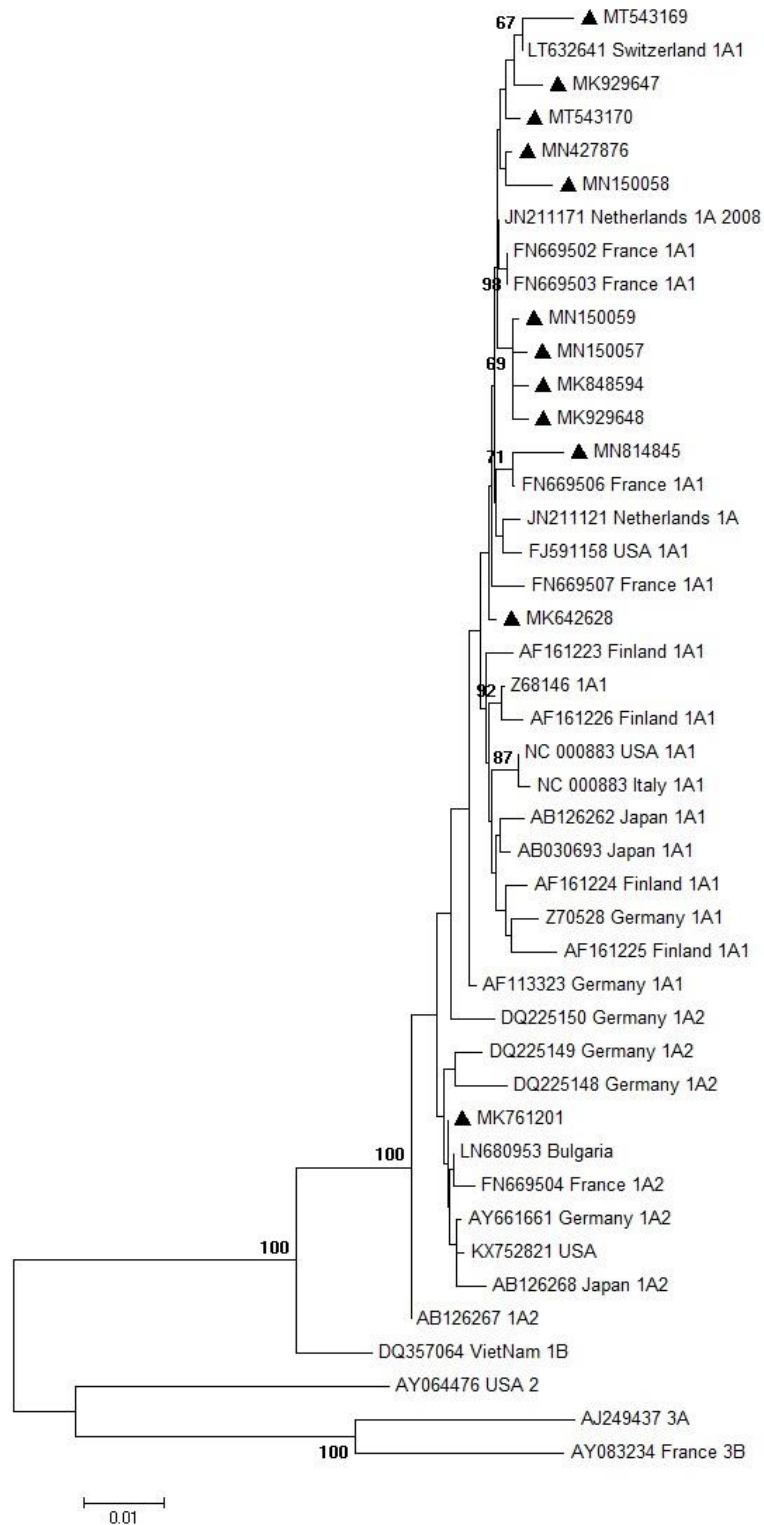


Рисунок 21 - Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения между исследованными изолятами PVB19, выделенными из образцов крови условно здоровых лиц Республики Казахстан (▲) в сравнении с представленными в международной базе данных Gene Bank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами Gene Bank с указанием генотипа, региона происхождения и даты сбора материала. Даны значения bootstrap ≥ 60

5.4 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов PVB19, выделенных из образцов крови условно здоровых жителей Республики Сербия

Для генетической характеристики были выбраны 9 изолятов, выделенные из образцов крови условно здоровых лиц разного возраста, вне зависимости от пола, лиц, проживающих в Республике Сербия. Генетические последовательности депонированы в международную базу данных Gene Bank под номерами MT543163- MT543167, MT554167- MT554170.

При филогенетическом анализе было показано, что все проанализированные изоляты принадлежат к генотипу 1A. При этом нуклеотидные последовательности также разделялись на две подгруппы: 2 изолята (22,2%) относились к подгруппе 1A1, 7 изолятов (77,8%) к подгруппе 1A2. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рисунке 22.

Среди образцов генотипа 1A2 можно отметить пять изолятов (MT554168, MT554169, MT543163, MT543164, MT543167), кластеризующихся с ранее описанными изолятами из Республики Албания и Республики Сербия. При оценке нуклеотидной идентичности исследованных нами изолятов сходство составило $99,5 \pm 0,25$. Отмечается сходство этих изолятов с образцом, выявленным в Республике Сербия в 2009 году (KR005643), ранее являвшимся единственным представленным в Gene Bank образцом на территории Республики Сербия, относившимся к PVB19 субтипа 1A2 [213]. Другие представленные в Gene Bank изоляты (FN295733-FN295737), собранные в 2011–2012 годах, относились к субтипу 1A1, и в данном исследовании не выявлено генетически близких с ними изолятов. Замещение одних эндемичных геновариантов другими на территории Республики Сербия, предположительно, может быть связано с импортированием, обусловленным развитием экономических и социокультурных связей.

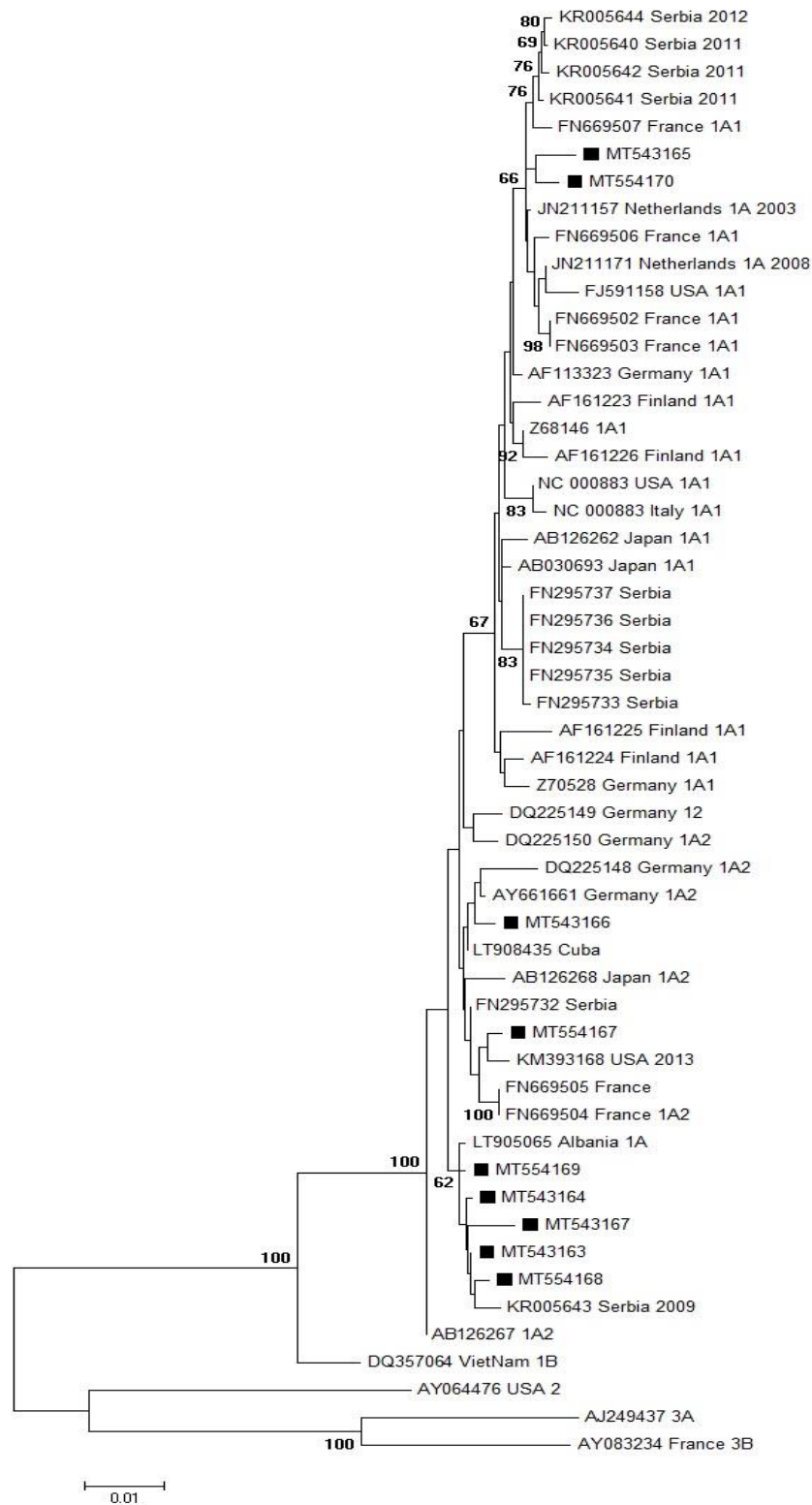


Рисунок 22 - Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными из образцов крови условно здоровых лиц Республики Сербия (■) в сравнении с представленными в международной базе данных Gene Bank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами Gene Bank с указанием генотипа, региона происхождения и даты сбора материала. Даны значения bootstrap ≥ 60

5.5 Сравнительный филогенетический анализ исследованных образцов

В целом, все выявленные в настоящем исследовании изоляты от условно здоровых лиц города Санкт-Петербург и Ленинградской области, Республики Казахстан, Республики Сербия, относятся к генотипу 1А (Рисунок 25).

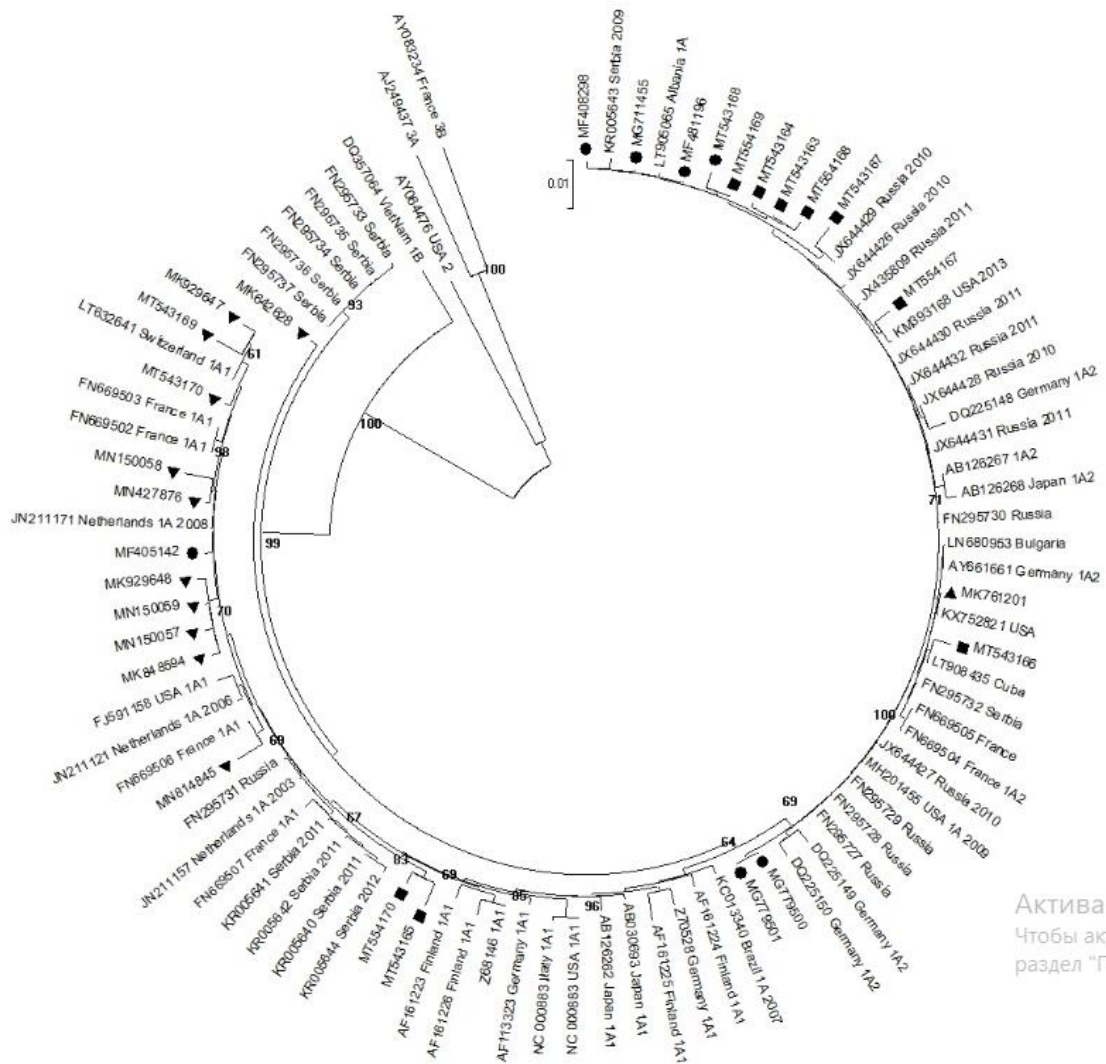


Рисунок 23. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными из образцов крови условно здоровых лиц г.Санкт-Петербург и Ленинградской области (●), Республике Казахстан (▲) и Республике Сербия (■) в сравнении с представленными в международной базе данных Gene Bank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами Gene Bank с указанием генотипа, региона происхождения и даты сбора материала. Даны значения $\text{bootstrap} \geq 60$

В каждой группе обнаруживались изоляты как подгруппы 1A1, так и подгруппы 1A2 с преобладанием того или иного субгенотипа в популяции. При сравнении изолятов парвовируса В19 обнаруживается сходство штаммов РVВ19 в подгруппах 1A1 и 1A2.

Вместе с тем отмечаются некоторые географические различия в распределении субтипов 1А: преобладание изолятов субтипа 1A1, выделенных из образцов крови условно здоровых лиц Республики Казахстан, и изолятов субтипа 1A2, выделенных из образцов крови условно здоровых лиц Российской Федерации и Республики Сербия. Выявление близких по нуклеотидному составу изолятов в пределах субтипа на территориях разных географических регионов может означать общее происхождение изолятов, а также свидетельствовать о распространении штаммов парвовируса В19, связанном с развитием культурно-экономических связей и взаимодействий. Детекция нуклеотидных последовательностей ДНК РVВ19, подтипа 1A2, кластеризующихся в отдельную ветвь (Республика Казахстан), может свидетельствовать об эндемичности этих изолятов для данной территории.

Можно также утверждать, что РVВ19 является активно циркулирующим вирусом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Парвовирусная инфекция является одной из недостаточно изученных проблем вирусологии, эпидемиологии и клинической медицины. Для расширения представлений о географических и социальных особенностях распространения инфекции, о влиянии ПВИ на течение онкологических заболеваний, хронических анемий, иммунодефицитных состояний и принципах диагностики ПВИ в группах риска, для расширения знаний о молекулярно-генетических особенностях парвовируса В19, требуются дальнейшие научные исследования.

В связи с этим были определены основные направления данной работы:

- изучение лабораторных маркеров ПВИ у здоровых лиц, проживающих в различных географических регионах;
- оценка влияния инфицированности PVB19 на течение основного заболевания пациентов из групп риска и разработка алгоритма лабораторного обследования этих лиц;
- выделение и филогенетический анализ изолятов PVB19, циркулирующих в разных географических регионах.

На первом этапе исследования анализировали распространенность ПВИ в разных когортах населения таких географических регионов как Восточная Европа (Российская Федерация и Республика Сербия), Средняя Азия (Республики Казахстан, Узбекистан, Таджикистан), Западная Африка (Гвинейская Республика).

Как упоминалось ранее, специфические иммуноглобулины G к парвовирусу В19 сохраняются пожизненно. Поскольку методов специфической профилактики парвовирусной инфекции не разработано, о ее распространении в той или иной популяции 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 г. Санкт-Петербург (РФ), трудовых мигрантов из стран Средней Азии, жителей Республики Казахстан, жителей Республики Сербия и Гвинейской республики. При этом была отмечена общая тенденция повышения уровня серопревалентности к РVВ19 в старших возрастных группах, что коррелирует с данными других авторов [10, 217, 162].

Вместе с тем были выявлены и существенные различия в формировании коллективного иммунитета к парвовирусу В19.

Наибольшие показатели серопревалентности выявлены в г. Нур-Султан, Республика Казахстан ($65,2 \pm 2,17\%$) и г. Санкт-Петербург ($62,1 \pm 2,72\%$); наименьшие – среди трудовых мигрантов из малонаселенных районов Республики Узбекистан и Республики Таджикистан ($47,4 \pm 4,68\%$). Промежуточное положение заняли показатели серопревалентности к РVВ19, выявленные в Гвинейской Республике ($53,9 \pm 2,78\%$), а также в Республике Сербия ($59,6 \pm 2,09\%$).

В городах с высокой плотностью населения и выраженными миграционными процессами создаются условия для активной циркуляции РVВ19. Так, г. Санкт-Петербург характеризуется активными социо-культурными связями между жителями, высокой долей организованных детей, посещающих дошкольные образовательные учреждения, большим количеством учащихся средних и высших образовательных учреждений (в том числе военных), с проживанием иногородних студентов в общежитиях и казармах. Широкое распространение ПВИ в г. Санкт-Петербург подтверждается и проведенными ранее исследованиями [12]. Столица Республики Казахстан, г. Нур-Султан, сопоставим с г. Санкт-Петербург по значительному количеству образовательных (средних и высших) и просветительских учреждений, промышленных предприятий, военных училищ и пр. Для этого города также характерны активная внутренняя и внешняя миграция.

Перечисленные факторы способствуют распространению ПВИ, что и подтверждается наиболее высокими показателями серопревалентности, выявленными в мегаполисах.

Активному формированию коллективного иммунитета к PVB19 способствуют длительные тесные контакты. Так, высокие показатели серопревалентности регистрировали среди курсантов военного училища г. Санкт-Петербург, где интенсивное формирование коллективного иммунитета к PVB19 (85,2% серопозитивных) регистрировали уже среди лиц 18-20 лет. Этот показатель существенно превышал показатель серопревалентности в той же возрастной группе условно здоровых жителей г. Санкт-Петербурга (33,3%). Интенсивное формирование коллективного иммунитета среди лиц 18-20 лет, видимо, связано с наличием скрытой циркуляции возбудителя в данной популяции. Это предположение подтверждается тем фактом, что в образце крови с содержанием ДНК PVB19, равным $1,1 \times 10^8$ МЕ/мл, определялись вирусспецифические IgM- и IgG-антитела. Свидетельством инфекционного процесса, скрыто протекающего в обследованном организованном коллективе, является также выявление существенного количества ДНК-положительных проб и высококопийных образцов в группах 18-30-летних курсантов и преподавателей. Учитывая, что обследованные курсанты военного училища являлись донорами крови и участвовали на постоянной основе в кроводачах, совершенно очевидна необходимость тестирования препаратов крови на ДНК парвовируса В19 с выбраковой пулов, содержащих более 10^4 копий/мл, во избежание передачи вируса при гематрансфузиях.

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 настоящее исследование включены образцы крови, полученные от трудовых мигрантов, прибывших в г. Санкт-Петербург из районов Средней Азии. Это районы с невысокой плотностью населения, слабо выраженной внутренней миграцией, небольшим количеством средних и высших учебных заведений, что видимо, и объясняет меньшее количество серопозитивных к PVB19 лиц среди

граждан Республики Узбекистан и Республики Таджикистан, по отношению к жителям мегаполисов (г. Санкт-Петербург и г. Нур-Султан).

Мигранты с низким уровнем популяционного иммунитета, безусловно, являются мишенью для инфицирования PVB19. Скученность проживания этих этнических общин, характерная для их пребывания в г. 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.

Средний, по отношению к другим географическим территориям, показатель серопревалентности к PVB19, полученный в Гвинейской Республике и Республике Сербия, связан, по-видимому, с тем, что образцы крови для данного этапа исследования не удалось ранжировать по территориям, откуда они поступали. Иммуноглобулины G определяли в одном пуле сывороток крови, полученных как в столичных городах (гг. Конакри, Белград), так и в малонаселенных районах этих стран.

Другая особенность формирования коллективного иммунитета к PVB19 связана с выявленными в ряде регионов различиями 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 ($23,6 \pm 5,0\%$), почти вдвое превышавшая долю ДНК-положительных проб, полученных от женщин той же возрастной группы. Эти результаты свидетельствуют, видимо, о более активной социальной роли лиц мужского пола и более активной циркуляции вируса среди молодых мужчин г. Нур-Султан. Это подтверждается наибольшим количеством образцов с более высокой копийностью ДНК ($\geq 1,0 \times 10^3 \text{МЕ/мл}$), что может являться показателем недавно перенесенной парвовирусной инфекции. В возрастной группе 41 год и старше

была отмечена вторая волна повышения доли ДНК-положительных образцов – до $17,2 \pm 4,05\%$. Как в этой возрастной группе, так и в группе лиц 31-40 лет, прирост ДНК-положительных проб произошел за счет лиц женского пола, и в целом, в образцах крови женщин ДНК парвовируса В19 выявлялась несколько чаще, чем у мужчин ($19,1 \pm 3,50\%$ и $13,3 \pm 1,80\%$, соответственно). Очевидно, этот факт объясняется более тесным контактом женщин с детьми в семьях, образовательных и лечебных учреждениях и может являться косвенным свидетельством активной циркуляции парвовируса среди детей г. Нур-Султан.

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, что коррелирует с данными, полученными в Республике Казахстан.

Напротив, в Российской Федерации и Республике Сербия не было выявлено гендерных различий среди серопозитивных лиц ни в одной из возрастных групп.

Как известно, Республика Казахстан и Гвинейская Республика – это страны, в которых ислам является доминирующей религией. Можно предположить, что особенности в национальном менталитете формируют социальное поведение в обществе. В силу сложившихся традиций, норм воспитания и поведения в обществе, лицам мужского пола отведена более активная социальная роль, более активное социальное взаимодействие уже с детского возраста. Следствие этого – более активная циркуляция вируса среди молодых мужчин, что в свою очередь оказывает влияние на напряженность популяционного иммунитета.

Таким образом, наличие гендерных различий при формировании коллективного иммунитета к PVB19 связано, видимо, с социокультурными особенностями той или иной страны.

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

Ранее было показано, что среди обследованных беременных женщин, проживающих в г. Санкт-Петербург, около 50% чувствительны к заражению PVB19 [18]. По результатам настоящего исследования, в Республике Казахстан не имеют защитных антител к PVB19 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 в данном регионе социальное взаимодействие может быть менее развито, в репродуктивном возрасте женщины, не имеющие антител к PVB19, могут заражаться, учитывая более тесные профессиональные (образовательные, медицинские услуги) и семейные контакты с детьми. В г. Санкт-Петербург, Республике Сербия и Гвинейской Республике более 50% женщин репродуктивного возраста не защищены от ПВИ.

Полученные результаты подтверждают актуальность парвовирусной инфекции не только для детей и подростков, но и для взрослых. А выявление ДНК PVB19 положительных проб из образцов крови, полученных со всех изученных территорий, свидетельствует о повсеместной циркуляции парвовируса В19.

Несмотря на низкую контагиозность ПВИ (индекс контагиозности 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.

В соответствии с поставленными задачами, следующий этап исследования был посвящен изучению распространения маркеров ПВИ у лиц с иммунодефицитными состояниями (ВИЧ-инфицированные пациенты), онкогематологических больных (реципиенты крови и костного мозга), больных анемиями (паразитарная хроническая анемия) и влияния инфицирования парвовирусом В19 на течение и прогноз основного заболевания.

Вирусные коинфекции у пациентов с ВИЧ-позитивным статусом, приводящие к изменению степени тяжести течения этих инфекций – важная проблема здравоохранения. Известно, что анемия является одним из осложнений

ВИЧ-инфекции. Описанные в литературе случаи стойкой анемии, явившейся результатом аплазии эритроцитарного ростка костного мозга, имеют тяжелые проявления, рецидивирующее течение и сложно поддаются лечению. Однако при своевременной диагностике и терапии внутривенными иммуноглобулинами анемия компенсируется [97, 133, 176, 193]. Парвовирус В19 можно рассматривать в качестве одного из этиологических агентов возникновения и развития анемии при ВИЧ-инфекции.

Вместе с тем, данные по распространению ПВИ у ВИЧ-инфицированных пациентов немногочисленны и разноречивы. Сообщается как о высокой распространенности ПВИ – до 10-31%% ДНК РVВ19 положительных образцов и низком уровне серопревалентности в обследуемой группе [82], так и об отсутствии положительных по ДНК образцов и серопревалентности на уровне 63-81%% [212; 205]. В некоторых исследованиях отмечается низкая распространенность анемии, связанной с парвовирусом В19, у ВИЧ-инфицированных лиц на фоне высокоактивной антиретровирусной терапии [52, 145].

Согласно результатам, полученным нами при обследовании 231 пациента с ВИЧ-инфекцией, серопревалентность к РVВ19 составила 79%; в 2,6% случаев в образцах крови была обнаружена ДНК РVВ19 с низким уровнем вирусной нагрузки. Эти показатели согласуются с результатами, полученными Abdollahi A., (2014) и Azevedo К.М. (2009).

Уменьшение доли серопозитивных к РVВ19 до 46% в возрастной группе 50 лет и старше может свидетельствовать о снижении синтеза антител до неопределяемого уровня из-за нарушений иммунного ответа ВИЧ-инфицированных пациентов.

В целом, несмотря на достаточно высокую серопревалентность к РVВ19, выявленную в целом по группе ВИЧ-инфицированных лиц, около половины обследованных пациентов в возрасте до 30 лет, а также в возрасте 51 год и старше не имели защитных антител к РVВ19. Такие пациенты находятся в группе риска по ПВИ. Наличие лабораторно подтвержденной анемии у двух пациентов с выявленной ДНК РVВ19, позволяет предположить ее связь с ПВИ.

Следующей группой лабораторно обследованных больных стали 54 пациента «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой» (возраст 0,6 – 19 лет), которым выполнялась алло-ТГСК. Большую часть обследованной группы составляли больные с острым миелобластным лейкозом – 37%. Больные острым лимфобластным лейкозом составили 26%; тяжелыми анемиями различного генеза – 15%. Треть пациентов (33%) находились в стадии ремиссии после ранее проведенного лечения. Большинство детей и подростков (51 из 54) наблюдали в течение 2 месяцев после алло-ТГСК. Трое пациентов за этот период времени скончались.

После выполнения алло-ТГСК на фоне миелодепрессии и клеточного иммунодефицита наблюдается закономерная активация вирусов группы герпеса и других вирусов, в том числе и парвовируса В19. Клиническая значимость активации PVB19 у иммунокомпромитированных пациентов до сих пор не оценена в должной мере.

В проведенном исследовании среднее содержание ДНК и уровни IgG-антител к PVB19 на момент трансплантации не коррелировали с возрастом обследованных пациентов, а также со статусом заболевания, общим состоянием пациентов и наличием дополнительных вирусных инфекций. Ни в одном образце крови не были обнаружены специфические антитела IgM к PVB19.

Вместе с тем, была показана достаточно высокая частота выявления других маркеров ПВИ (IgG, ДНК PVB19) в крови реципиентов алло-ТГСК. Серопревалентность к PVB19 составила 68,5-80,4%, что более чем в 2 раза выше, чем среди здорового населения той же возрастной категории [21, 216]. Этот факт, вероятно, может объясняться тем, что большинство пациентов в исследуемой группе имели в анамнезе более 10 гемотрансфузий и получали внутривенные иммуноглобулины. Несмотря на использование современных методов инаktivации инфекционных агентов в трансфузионных средах, имеются данные, что риск возможной контаминации производственных пулов плазмой с ДНК PVB19 в концентрации равной 10^6 МЕ/мл, составляет в среднем 0,8 – 25 % [5]. Парвовирус В19 представляет особую опасность для лиц, получающих

иммуносупрессивную и цитостатическую терапию. Тем не менее, ПВИ отсутствует в перечне инфекций, рекомендованных ВОЗ к обязательному тестированию для доноров крови, так же как и для доноров костного мозга [203, 223].

Полученные результаты выявления ДНК РVВ19 в 28,0 –30,4%% случаев у пациентов до и после алло-ТГСК полностью согласуются с исследованием Rahiala et al. (104), в котором ДНК РVВ19 была обнаружена в крови у 30% больных (до или после ТГСК), при пиковых концентрациях вируса через 2 месяца после трансплантации. Так же как в нашей работе, у пациентов с активацией вируса не было выявлено специфической клинической симптоматики, которую можно было бы трактовать как парвовирусную инфекцию.

С другой стороны, имеются литературные данные о меньшей частоте выявления маркеров ПВИ. Так, ДНК РVВ19 была обнаружена у 9,2% больных с патологией кроветворной системы [22].

Парвовирус В19, выявленный как в исходных пробах, так и через 30-60 суток после алло-ТГСК, может быть причиной развития целого ряда неблагоприятных реакций. Получены достоверные свидетельства того, что инфицированность РVВ19 может быть существенным фактором развития нейтро- и тромбоцитопений ($r=-0,422$; $p=0,002$, $r=-0,422$; $p=0,001$ соответственно), 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 ($r=0,315$; $p=0,034$).

Достоверная корреляция выявлена также между исходной вирусной нагрузкой (до алло-ТГСК) и уровнями IgG-антител к парвовирусу в разные сроки наблюдения. Наиболее отчетливо установлена зависимость между наличием ДНК РVВ19 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: $r=0,274$, $p=0,02$; $r=0,461$, на 60 день: $p=0,0004$). 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 ($r=0,315$; $p=0.034$; $n=46$). Период полужизни изогенных антител класса IgG в организме человека составляет 1-4 недели [124]. 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. Таким образом, были получены данные о важности определения уровней иммуноглобулинов G к PVB19 в динамике для прогнозирования возможной дисфункции трансплантата.

В целом полученные в данной группе больных результаты доказывают, что инфицирование парвовирусом B19 может существенно отягощать течение основного заболевания у пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Третьей группой больных, стали больные с хронической паразитарной анемией. Гематологические нарушения, связанные с инфекцией PVB19 у больных с хроническими анемиями, вызванными простейшим рода *Plasmodium*, широко распространены в местностях, эндемичных по малярии.

Известно, что у серонегативных лиц при первичном инфицировании парвовирус в острой фазе может вызывать нарушение образования эритроцитов вплоть до 5-7 дней, что приводит к значительному снижению гемоглобина [156, 157]. Эритроциты являются также основной мишенью малярийного плазмодия, который, размножаясь, разрушает их и вызывает анемию различной степени тяжести. По мнению ряда авторов, инфицирование ПВИ происходит на фоне снижения клеточного иммунитета, вызванного *P. falciparum* [218, 37]. Имеются данные, что в эндемичных для малярии регионах тяжёлые формы анемии являются главной причиной детской смертности, составляя от 17 до 54% случаев [207, 112].

В данном исследовании доказана выраженная негативная роль 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 общего количества детей данной возрастной группы – сопровождалось осложнённым течением болезни и

достоверно чаще приводило к смерти больного ($p=0,0003$; $RR =13,688$; $95\% CI: 3,034 - 61,740$).

Зависимость осложненного течения малярии при ПВИ от возраста больного объясняется, по-видимому, следующим: чем старше пациент, тем выше вероятность наличия у него иммунитета к парвовирусу, и, следовательно, тем меньшее влияние оказывает ПВИ в случае сочетанной инфекции. Первичное заражение, которое, как правило, приходится на ранний детский возраст, наоборот, может усугублять течение малярии, особенно на фоне других неблагоприятных условий (дефицит железа, недоедание, гельминтные инвазии, коинфекции и пр.) При этом инфицирование PVB19 становится критическим фактором, который может провоцировать злокачественное течение анемии с угрозой для жизни, а также вызывать другие осложнения.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей по изучению сочетанной ПВИ-малярийной инфекции у детей в регионах с высоким уровнем заболеваемости малярией: среди детей до 5 лет абсолютное большинство случаев ПВИ сопровождалось осложнённым течением малярии [218, 208, 157], что свидетельствует о необходимости контроля за ситуацией с распространённостью парвовирусной инфекции в странах, эндемичных по малярии.

Результаты, полученные в данной работе и другими исследователями [3, 52, 104, 145, 156, 157, 208, 118, 159,], свидетельствуют о том, что инфицирование парвовирусом В19 пациентов с хроническими анемиями, онкологических больных, лиц с иммунодефицитами, может отягощать течение и ухудшать прогноз основного заболевания, что подтверждает высокую медицинскую значимость парвовирусной инфекции для этой категории больных.

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; иммуноглобулины класса М определяются 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 ВИЧ-инфицированных пациентов основным критерием обследования на ПВИ является стойкая анемия. Для пациентов онкогематологического профиля основанием для обследования на ПВИ является процедура алло-ТГСК, которая планируется или проводится данному больному. Основопологающим фактором обследования больных малярией является возраст больного, так как именно у детей младшего возраста коинфицирование малярийным плазмодием и парвовирусом В19 может явиться фатальным.

Таким образом, использование предложенных в разделе 4.4 алгоритмов диагностики ПВИ в группах риска может способствовать, на наш взгляд, выявлению причин неблагоприятного развития основного заболевания, связанных с инфицированием PVB19, и своевременной коррекции применяемой терапии.

Наличие ДНК-PVB19-положительных проб в образцах крови, которые были получены из всех включенных в исследование географических регионов, свидетельствует о широкой циркуляции парвовируса В19. Вместе с тем сведения о распространенных в данных регионах генотипах PVB19 в специальной литературе немногочисленны, что послужило основанием для выполнения третьего этапа собственных исследований – выделению и филогенетическому анализу геновариантов парвовируса В19, изолированных в отдельных странах.

На основании генетического анализа парвовируса В19 выделяют генотипы 1А, 1В, 2, 3А, 3В, которые имеют различное территориальное распространение. Исследовательские работы, посвященные анализу генотипической структуры вируса, позволили выявить географическое распространение парвовируса В19 генотипа 1 вируса. Он наиболее часто встречается в странах Европы, Китае, Корее и Таиланде [116]. Анализ последовательностей В19V показывает одновременное присутствие групп РVВ19 1А1 и 1А2 во всем мире [87].

Золотым стандартом для классификации генотипов и субтипов парвовируса В19 является прямое секвенирование нуклеотидной последовательности. Однако используемые для выявления вируса методики на основе технологии ПЦР недостаточно чувствительны для выявления вируса при низких концентрациях и/или основаны на выявлении коротких консервативных фрагментов нуклеотидных последовательностей, что не позволяет осуществлять глубокое типирование вируса. Учитывая, что среди ДНК-положительных к парвовирусу В19 проб, полученных в предыдущих разделах исследования, преобладали образцы плазмы с невысокой вирусной нагрузкой, одной из задач настоящей работы стала разработка метода детекции ДНК РVВ19 в низкокопийных образцах плазмы.

Основанием для такого исследования стал разработанный ранее группой авторов (патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера») метод выявления и глубокого типирования вируса гепатита В (ВГВ) при низкой вирусной нагрузке [2]. Метод заключается в применении гнездовой ПЦР, при этом на первом этапе используется асимметричная ПЦР с протяженными праймерами. На втором этапе используются праймеры к одному из четырех регионов генома ВГВ. По аналогии, на основе двухэтапной ПЦР, был разработан способ выявления в биологическом материале ДНК РVВ19. Выявление парвовируса В19 проводится методом «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, в том числе фрагменты, включающие рекомендованный для гено- и субтипирования парвовируса В19 регион NS1/VP1 область 2120-3110 нт., согласно представленному в международной базе данных Gene Bank изоляту J35 (AY386330) [56].

В исследование были включены 30 изолятов PVB19, выделенные в период 2012-2020 гг. в Российской Федерации, Республике Сербия и Республике Казахстан.

Нуклеотидные последовательности девяти изолятов PVB9, полученных в СЗФО РФ, депонированы в международную базу данных Gene Bank (MH534950, MH166338, MG779501, MG779500, MG711455, MF481196, MF408298, MF405142, MT543168) и отнесены к генотипу 1 субтипу 1А. Семь изолятов, использованных для установления филогенетических связей, разделились на две подгруппы: 6 изолятов (85,7%) относились к подгруппе 1А2, один изолят – к подгруппе 1А1(14,3%).

Изоляты MF405142, MG779500, MG779501 оказались сходны с различными изолятами из Нидерландов и Эстонской Республики; MF481196, MG711455, MF408298 – с изолятом из Республики Албания. Последовательности тесно связаны с обнаруженными на территориях Российской Федерации в более ранний период (2005-2011 гг.), что свидетельствует о продолжающейся вирусной циркуляции. Однако имеет место и некоторый уровень кластеризации штаммов, выявленных на Северо-Западе России в 2005-2011 гг. и 2014-2017 гг. Этот факт объясняется, видимо, импортированием на территории СЗФО штаммов из других регионов.

По результатам филогенетического анализа изолятов, полученных на территории Республики Сербия, установлено, что все девять последовательностей также принадлежат к генотипу 1А и разделяются на две подгруппы: семь изолятов (77,8%) отнесены к подгруппе 1А2, два изолята (22,2%) – к подгруппе 1А1.

Среди образцов генотипа 1А2 можно отметить пять изолятов (MT554168, MT554169, MT543163, MT543164, MT543167), кластеризующихся с ранее описанными изолятами из Республики Албания 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 ранее являвшимся единственным представленным в Gene Bank изолятом, полученным с территории Республики Сербия [213]. Другие изоляты, представленные в Gene Bank (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 импортированием ранее не характерных для данной территории геновариантов.

При исследовании 12 образцов, выделенных на территории Республики Казахстан, установлена принадлежность всех изолятов PVB19 к генотипу 1A и разделение штаммов на подгруппы. При этом 91,7% изолятов идентифицированы как принадлежащие к генотипу PVB19 1A1, и сходны с изолятами коллекции Gene Bank, поступившими из Франции, Италии, Германии, Швейцарии, Японии и США.

В целом все выявленные в настоящем исследовании изоляты из России, Республики Сербия и Республики 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).

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 нами результаты согласуются с результатами работ других исследователей, согласно которым генотип 1 является наиболее распространенным геновариантом PVB19. Изоляты, принадлежащие к генотипу 1A, постоянно циркулируют в разных странах мира от Японии и США до стран Центральной, Западной и Восточной Европы (Германия, Франция, Италия, Албания, Финляндия, РФ, Республика Сербия) [67, 86, 116, 128].

Важным фактором отсутствия выраженной изменчивости парвовируса В19 является тот факт, что до настоящего времени не разработаны препараты специфической профилактики ПВИ. Возбудитель инфекции циркулирует в условиях естественного распространения, при отсутствии «иммунного пресса», создаваемого массовым применением вакцин (как, например, это имеет место в период борьбы с корью в глобальном масштабе), что, видимо, позволяет вирусу сохранять достаточно высокую степень генетической однородности.

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 РФ и Республики Сербия. Особое внимание обращает на себя один из кластеров подтипа 1А1, включающий последовательности ДНК РVВ19, изолированные в Республике Казахстан, и депонированные в коллекцию Gene Bank под номерами, МК929648, MN150057, МК848594, MN150059. Эта группа представлена изолятами, с высокой степенью сходства внутри кластера и отличающихся от других представленных последовательностей в в коллекции Gene Bank, что является генетическим свидетельством их эндемичности для территории Республики Казахстан и отсутствия распространения изолятов данного кластера за пределы географического ареала.

Таким образом, в ходе диссертационного исследования подтверждено широкое распространение ПВИ, доказано влияние инфицированности РVВ19 на течение основного заболевания пациентов из групп риска, проведен филогенетический анализ изолятов РVВ19, циркулирующих в разных регионах Евразийского континента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, можно утверждать, что 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. Все изученные в рамках данной работы изоляты вируса, выделенные на территориях Евразийского континента, отнесены к генотипу 1А и распределены на субтипы 1А1 и 1А2, с преобладанием того или иного субтипа в разных географических регионах.

Парвовирусная инфекция – убикивитарная инфекция, и ее широкое распространение, а также доброкачественное и самоограничивающееся в большинстве случаев клиническое течение обычно приводят к снижению оценки ее роли 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 индивидуумов.

Парвовирус В19 может являться 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 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 г. Санкт-Петербург доля серопозитивных к PVB19 лиц составила 85,8%, достоверно превышая аналогичный показатель среди населения, 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 крупных городов – г. Санкт-Петербург и г. Нур-Султан (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% 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 в перечень исследований, обязательных для тестирования, исследование крови доноров на парвовирусную инфекцию, что позволит предупредить гемоконтактное заражение при трансфузиях донорской крови.
3. В очагах парвовирусной инфекции следует выявлять контактные лица из групп риска. Рекомендуется проводить динамическое клинико-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 из биологического материала ДНК парвовируса В19 из образцов с низкой концентрацией нуклеиновой кислоты целесообразно использовать разработанный в рамках данного исследования способ на основе двухэтапной 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 Российской Федерации. 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 более глубокому пониманию особенностей распространения вируса и его геновариантов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЕ

1. АЛТ – аланинаминотрансфераза
2. Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
3. АРВТ – антиретровирусная терапия
4. АСТ – аспаргатаминтрансфераза
5. ВГВ – вирус гепатита В
6. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
7. ВКО – внутренний контрольный образец
8. ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
9. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
10. ИК – индекс контагиозности
11. ИФА – иммуноферментный анализ
12. ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ
13. КОЕ – Э – унипотентная гемопоэтическая клетка
14. Me - медиана
15. НК – нуклеиновая кислота
16. Нт – нуклеотид
17. ПВИ - парвовирусная инфекция
18. СЗФО - Северо-Западный федеральный округ
19. СКВ – системная красная волчанка
20. П.о. - пары оснований
21. ПЦР - полимеразная цепная реакция
22. РНК - рибонуклеиновая кислота
23. ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
24. ААV – адено-ассоциированный вирус
25. GARDH - глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа
26. EBV - вирус Эпштейн-Барра
27. ЕРС – предшественники эритроцитов
28. Еро/Еро-R – эритропоэтин/рецептор к эритропоэтину

29. CMV- цитомегаловирус
30. IgG, IgM - иммуноглобулин класса G, класса M
31. IL – интерлейкин
32. HHV6 – вирус герпеса 6
33. PVB19 - Human parvovirus B19, парвовирус B19
34. ssDNA – одноцепочечная ДНК
35. SD – стандартное отклонение
36. SE - стандартная ошибка среднего
37. VP1, VP2 - структурные белки ДНК парвовируса B19

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии (с изменениями от 12 октября 2010 г.): Постановление Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 (ред. от 04.09.2010) // Собрание законодательства Российской Федерации. 2010, № 5, ст. 536. 31 с.
2. Пат. 2633755 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 C12Q 1/70. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР / Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян А. А.; патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». - №2016144898; заявл. 15.11.2016; опубл. 17.10.2017, Бюл. изобр. №29 - 11 с.
3. Влияние коинфицирования PVB19 и Plasmodium Falciparum на течение и прогноз малярии / И.Н. Лаврентьева, И.В. Хамитова, А.В. Слита [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2018. — Т. 8, № 3. — С. 383–387.
4. Вспышка парвовирусной инфекции в Северо-Западном Федеральном округе России / А.Ю. Антипова, И.Н. Лаврентьева, М.А. Бичурина [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 3. — С. 665–668.
5. Выявление ДНК парвовируса В19 среди доноров плазмы для фракционирования Кировской области / А.Л. Попцов, И.В. Парамонов, Н.Ю. Фетищева // Вестник службы крови России. — 2013. — № 2. — С. 33–36.
6. Выявление парвовируса В19 в крови российских доноров / М.А. Элижбаева, И.С. Февралева, О.А. Глинщикова [и др.] // Гематология и трансфузиология. — 2011. — Т. 56, № 2. — С. 10–13.
7. Генотипирование изолятов парвовируса В19, циркулирующих в Северо-Западном федеральном округе России / И.Н. Лаврентьева, А.И. Антипова, А.В. Семенов, М.А. Бичурина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2013. — №6. — С. 36–43.

8. Ермолович М. А. Распространенность IgG-антител к парвовирусу В19 среди жителей Республики Беларусь / М.А. Ермолович, А.М. Дронина, Е.О. Самойлович // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2014. — № 2 (75). — С. 27–32.
9. Ермолович М.А. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции (2005–2016) / М.А. Ермолович, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. — 2019. — № 16(1). — С. 35–45.
10. Клинико-эпидемиологические особенности и профилактика парвовирусной инфекции / О.Н. Никишов, А.А. Кузин, А.Ю. Антипова, И.Н. Лаврентьева // Военно-медицинский журнал. — 2016. — № 337(8). — С. 45–50.
11. Клинико-эпидемиологические особенности парвовирусной инфекции / А.В. Редненко, В.М. Семёнов, Т.И. Дмитраченко [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2019. — Т. 18, № 3.— С. 234–240.
12. Лаврентьева И.Н. Парвовирус В19 человека: характеристика возбудителя, распространение, диагностика обусловленной им инфекции. / И.Н. Лаврентьева, А.Ю. Антипова // Инфекция и иммунитет. — 2013. — Т. 3, № 4. — С. 311-322.
13. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19, циркулирующих на территории Северо-Западного федерального округа / И.В. Хамитова, Ю.В. Останкова, А.Ю. Антипова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2018.— №6.— С. 55-66.
14. Определение маркеров парвовируса В19 в крови доноров / Е.В. Филатова, Н.В. Зубкова, Н.А. Новикова. [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2010. — № 5. — С. 67–70.
15. Оценка безопасности производства препаратов альбумина в отношении парвовируса В19 / Е.В. Филатова, Н.В. Зубкова, Т.В. Короткова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2012. — № 1-1. — С. 96–99.

16. Парвовирусная инфекция. Значимость и возможность специфической профилактики / А.Ю. Антипова, И.В. Хамитова, О.Н. Никишов, И.Н. Лаврентьева // Медицинская иммунология. — 2015. — Т. 17, № 5. — С. 153.

17. Распространенность маркеров парвовирусной инфекции среди различных групп населения / О.Н. Никишов, А.А. Кузин, И.Н. Лаврентьева, А.Ю. Антипова // Вестник Российской Военно-медицинской академии. — 2018. — № S1. — С. 136–138.

18. Распространение парвовирусной инфекции в Северо-Западном федеральном округе России / А.Ю. Антипова, И.Н. Лаврентьева, М.А. Бичурина [и др.] // Журнал инфектологии. — 2011. — №3(4). — С. 44–48.

19. Распространение парвовирусной инфекции В19 при онкогематологических заболеваниях / Т.А. Зыкова, Е.А. Шевякова, И.Б. Лысенко, С.А. Кузнецов // Медицинская иммунология. — 2017. — Т. 19, № 5. — С. 187.

20. Сравнительные эпидемиологические аспекты парвовирусной инфекции В19 у больных с острыми экзантемными заболеваниями и гематологической патологией / М.А. Ермолович, Н.В. Климович, В.А. Матвеев [и др.] // Медицинский журнал. — 2011. — № 3. — С. 61–65.

21. Тихонова Н.Т. Оценка распространения парвовирусной инфекции в Москве: информационное письмо // Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова, Т.Н. Москалева; Комитет здравоохранения г. Москвы. — М., 2004. — № 11. — 12 с.

22. Частота выявления и значение парвовирусной В19 инфекции у пациентов с гематологической патологией и с острыми экзантемными заболеваниями / Н.В. Климович, В.А. Матвеев, М.А. Ермолович [и др.] // Клиническая инфектология и паразитология. — 2013. — № 2(05). — С. 125–128.

23. Чернова Т.М. Парвовирус В19 как причина кардита в сочетании с миозитом / Т.М. Чернова, М.Ф. Дубко // Медицинский совет. — 2018. — № 2. — С. 190–193.

24. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression / S. Moffatt, N. Tanaka, K. Tada [et al.] // J Virol. — 1996. — 70 (12). — P. 8485–8491.

25. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion / S.H. Kleinman, S.A. Glynn, T.H. Lee [et al.] // *Blood*. — 2009. — 114(17). — P. 3677–3683.
26. Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity / M. Söderlund, C.S. Brown, B.J. Cohen, K. Hedman // *J Infect Dis*. — 1995. — №171. — P. 710–713.
27. Activation of synoviocytes by the secreted phospholipase A2 motif in the VP1-unique region of parvovirus B19 minor capsid protein / J. Lu, N. Zhi, S. Wong, K.E. Brown // *J. Infect. Dis*. — 2006. — №193. — P. 582–590.
28. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection / Y. Uchida, K. Matsubara, T. Morio [et al.] // *Pediatr Infect Dis J*. — 2012 — №31. — P. 427.
29. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection / A. Hatakka, J. Klein, R. He [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2011. — 49(9). — P. 3422–3424.
30. Acute Parvovirus B19 Infection and Anemia during Plasmodium falciparum Malaria / F. Scarlata, E. Gianelli, S. Miceli [et al.] // *Clin. Infectious Dis*. — 2002. — 35(11). — P. 1449–1451.
31. Agranulocytosis associated with parvovirus B19 infection in otherwise healthy patients / V. Istomin, E. Sade, Z. Grossman [et al.] // *Eur J Intern Med*. — 2004. — №15. — P. 531–533.
32. Ancient human parvovirus B19 in Eurasia reveals its long-term association with humans / D. Mühlemann, A. Margaryan, P.B. Damgaard [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2018. — 115 (29). — P. 7557–7562.
33. Anderson L.J. Role of parvovirus B19 in human disease / L.J. Anderson // *Pediatr Infect Dis J*. — 1987. — №6. — P. 711–718.
34. Anderson M.J. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA / M.J. Anderson, S.E. Jones, A.C. Minson // *J Med Virol*. — 1985. — №15. — P. 163–172.

35. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis / A. von Poblitzki, A. Hemauer, A. Gigler [et al.] // *J Infect Dis.* — 1995. — №172. — P. 1356–1359.

36. Antibody-mediated enhancement of parvovirus B19 uptake into endothelial cells mediated by a receptor for complement factor C1q / K. von Kietzell, T. Pozzuto, R. Heilbronn, T. Grössl [et al.] // *Virol.* — 2014. — 88(14). — P. 8102–8115.

37. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum* / M. Ho, H.K. Webster, S. Looareesuwan [et al.] // *J Infect Dis.* — 1986. — №153. — P. 763–771.

38. A pilot study on parvovirus B19 infection in paediatric haematological malignancies / J. Kishore, M. Sen, A. Kumar, A. Kumar // *Indian J Med Res.* — 2011. — №133. — P. 407–413.

39. Aplastic crisis due to extensive bone marrow necrosis in sickle cell disease / D.M. Pardoll, R.J. Rodeheffer, R.R. Smith, S. Charache // *Arch Intern Med.* — 1982. — V. 142. — P. 2223–2225.

40. A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA / C. Aberham, C. Pendl, P. Gross [et al.] // *J Virol Methods.* — 2001. — №92. — P. 183–191.

41. Arend W.P. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis / W.P. Arend, J.M. Dayer // *Arthritis Rheum.* — 1990. — № 33. — P. 305–315.

42. Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy / A. Moudgil, C.C. Nast, A. Bagga [et al.] // *Kidney Int.* — 2001 Jun. — №59(6). — P. 2126–2133.

43. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction / K.O. Schowengerdt, J. Ni, S.W. Denfield [et al.] // *Circulation.* — 1997. — №96. — P. 3549–3554.

44. Atypical manifestations of congenital parvovirus B19 infection / I. Savarese, M.P. De Carolis, S. Costa [et al.] // *Eur J Pediatr.* — 2008. — №167. — P. 1463–1466.

45. Autoantibody reaction to myelin basic protein by plasma parvovirus B19 IgG in MS patients / G. Thomas, L. Rael, R. Shimonkevitz [et al.] // *Protein Pept Lett.* — 2006. — №13. — P. 109–111.
46. Biesma D.H. Life-threatening anaemia caused by B19 parvovirus infection in a non-immunocompromised patient / D.H. Biesma, H.K. Nieuwenhuis // *Neth J Med.* — 1997. — №50. — P. 81–84.
47. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3 / F. Ekman, K. Hokynar, L. Kakkola [et al.] // *J Virol.* — 2007 Jul. — 81(13). — P. 6927–6935.
48. Bone marrow necrosis and fat embolism syndrome in sickle cell disease: Increased susceptibility of patients with non-SS genotypes and a possible association with human parvovirus B19 infection / D.A. Tsitsikas, G. Gallinella, S. Patel [et al.] // *Blood Rev.* — 2014. — №28. — P. 23–30.
49. Bonvicini F. B19 infection in pregnancy-awareness and opportunities / F. Bonvicini, G. Bua, G. Gallinella // *Curr. Opin. Virol.* — 2017. — №27. — P. 8–14.
50. Brass C. Academy rash, a probable epidemic of erythema infectiosum (fifth disease) / C. Brass, L.M. Elliott, D.A. Stevens // *JAMA.* — 1982. — №248. — P. 568–572.
51. Brown K.E. Parvovirus B19 infection and hematopoiesis / K.E. Brown, N.S. Young // *Blood Rev.* — 1995. — 9(3). — P. 176–182.
52. Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients / R.F.A. Pereira, R.d.C.N.C. Garcia, K.M.L. de Azevedo [et al.] // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* — 2014. — 109. — P. 168–173.
53. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults / A.D. Woolf, G.V. Campion, A. Chishick [et al.] // *Arch Intern Med.* — 1989. — №149. — P. 1153–1156.
54. Co-infection of human parvovirus B19 with *Plasmodium falciparum* contributes to malaria disease severity in Gabonese patients / N.L. Toan, B.T. Sy, L.H. Song [et al.] // *BMC Infect Dis.* — 2013. — №13. — P. 375.
55. Collapsing glomerulopathy in a young woman with APOL1 risk alleles following acute parvovirus B19 infection: A case report investigation / W.Besse, S. Mansour, K. Jatwani [et al.] // *BMC Nephrol.* — 2016. — №17. — P. 125.

56. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19 / N. Zhi, Z. Zadori, K.E. Brown, P. Tijssen et al. // *Virology*. — 2004. — №318. — P. 142–152.
57. Corcoran A. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19 / A. Corcoran, S. Doyle // *J Med Microbiol*. — 2004 Jun. — 53(6). — P. 459–475.
58. Corcoran A. B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1 / A. Corcoran, B.P. Mahon, S. Doyle // *J Infect Dis*. — 2004. — №189. — P. 1873–1880.
59. Cytokine responses in acute and persistent human parvovirus B19 infection / A. Isa, A. Lundqvist, A. Lindblom [et al.] // *Clin Exp Immunol*. — 2007. — №147. — P. 419–425.
60. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction / F. McOmish, P.L. Yap, A. Jordan [et al.] // *J Clin Microbiol*. — 1993. — №31(2). — P. 323–328.
61. Different patterns of skin manifestations associated with parvovirus B19 primary infection in adults / V. Mage, D. Lipsker, S. Barbarot [et al.] // *J Am Acad Dermatol*. — 2014. — №71. — P. 62–69.
62. Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins / E. Manaresi, E. Zuffi, G. Gallinella [et al.] // *J. Med. Virol*. — 2001. — №64. — P. 67–73.
63. Doerig C. A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo / C. Doerig, P. Beard, D. Hirt // *Virology*. — 1987. — №157. — P. 539–542.
64. Douvoyiannis M. Neurologic manifestations associated with parvovirus B19 infection / M. Douvoyiannis, N. Litman, D.L. Goldman // *Clin Infect Dis*. — 2009. — №48. — P. 1713–1723.
65. Effects of human parvovirus B19 on expression of defensins and Toll-like receptors / G.J. Hsu, B.S. Tzang, C.C. Tsai [et al.] // *Chin J Physiol*. — 2011. — №54. — P. 367–376.

66. Effects of Parvovirus B19 Infection in Renal Transplant Recipients: A Retrospective Review of Three Cases / P. Krishnan, P. Ramadas, P.P. Rajendran [et al.] // *Int J Angiol.* — 2015. — 24(2). — P. 87–92.

67. Enders M. Current epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection during pregnancy and childhood in the western part of Germany / M. Enders, A. Weidner, G. Enders // *Epidemiol Infect.* — 2007. — 135(4). — P. 563–569.

68. Epidemiologic study of human parvovirus B19 infection in East China / L. Zhang, C. Cai, F. Pan [et al.] // *J Med Virol.* — 2016. — 88(7) — P. 1113–1119.

69. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19 / M. Söderlund, C.S. Brown, W.J. Spaan [et al.] // *Infect Dis.* — 1995 Dec. — 172(6). — P. 1431–1436.

70. Existence of various human parvovirus B19 genotypes in Chinese plasma pools: genotype 1, genotype 3, putative intergenotypic recombinant variants and new genotypes / J. Jia, Y. Ma, X. Zhao [et al.] // *Virol J.* — 2016. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027099/> (дата обращения: 15.02.2020).

71. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication / S. Wong, N. Zhi, C. Filippone [et al.] // *J Virol.* — 2008 Mar. — 82(5). — P. 2470–2476.

72. Experimental parvoviral infection in humans / M.J. Anderson, P.G. Higgins, L.R. Davis LR [et al.] // *J Infect Dis.* — 1985. — №152. — P. 257–265.

73. Extinct type of human parvovirus B19 persists in tonsillar B cells / L. Pyöriä, M. Toppinen, E. Mäntylä [et al.] // *Nat Commun*, 2017. — Текст: электронный. — URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms14930/> (дата обращения: 13.02.2020).

74. Falciparum malaria and parvovirus B19 coinfection: A rare entity / R. Agarwal, R. Baid, R. Datta [et al.] // *Trop Parasitol.* — 2017. — 7 (1). — P. 47–48.

75. Familial crises in congenital haemolytic disease / J.L. Horne, H. Lederer, H.J.R. Kirkpatrick, D.G. Leys // *Lancet.* — 1945. — 246 (6359). — P. 33–36.

76. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease / B.D. Bultmann, K. Klingel, K. Sotlar [et al.] // *Hum Pathol.* — 2003. — №34. — P. 92–95.

77. Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases / M. Enders, A. Weidner, I. Zoellner [et al.] // *Prenat Diagn.* — 2004. — №24. — P. 513–518.

78. Fetal parvovirus B19 infection associated with myocardial necrosis / M.A. Lambot, J.C. Noel, M.O. Peny [et al.] // *Prenat Diagn.* — 1999. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190682/> (дата обращения: 24.05.2020).

79. Florea A.V. Parvovirus B19 Infection in the Immunocompromised Host / A.V. Florea, D.N. Ionescu, M.F. Melhem // *Arch Pathol Lab Med.* — 2007. — №131. — P. 799–804.

80. Focal epilepsy as a long term sequela of parvovirus B19 encephalitis / C.I. Palermo, C.M. Costanzo, C. Franchina [et al.] // *J Clin Virol.* — 2016. — №80. — P. 20–23.

81. Franssila R. T-helper cell-mediated interferon-gamma, interleukin-10 and proliferation responses to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19 / R. Franssila, K. Hedman // *Vaccine.* — 2004. — №22. — P. 3809–3815.

82. Frequency and genotype of human parvovirus B19 among Iranian patients infected with HIV / K. Azadmanesh, M. Mohraz, M. Kazemimanesh [et al.] // *J Med Virol.* — 2015. — №87(7). — P. 1124–1129.

83. Gallinella G. Parvovirus B19 Achievements and Challenges / G. Gallinella // *ISRN Virology.* — 2013. — Текст: электронный. — URL: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/898730/> (дата обращения: 15.10.2019).

84. Ganaie S.S. Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19 / S.S. Ganaie, J. Qiu // *Front Cell Infect Microbiol.* 2018. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996831/pdf/fcimb-08-00166.pdf> (дата обращения: 24.12.2019).

85. Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins / A. Gigler, S. Dorsch, A. Hemauer [et al.] // *Virology* — 1999. — №73. — P. 1974–1979.

86. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes / A. Servant, S. Laperche, F. Lallemand [et al.] // *J Virol*. — 2002. — 76(18). — P. 9124–9134.

87. Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions / M.W. Molenaar-de Backer, V.V. Lukashov, R.S. van Binnendijk [et al.] // *PLoS One*, 2012. — Текст: электронный. — URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043206/> (дата обращения: 24.12.2019)

88. Haematological parameters of parvovirus B19 infection in 13 fetuses with hydrops foetalis / F. Forestier, J.D. Tissot, Y. Vial [et al.] // *Br J Haematol*. — 1999. — №104. — P. 925–927.

89. Heegaard E.D. Human Parvovirus B19 / E.D. Heegaard, K.E. Brown. // *Clin Microbiol Rev*. — 2002. — №15(3). — P. 485–505.

90. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction / C. Tschöpe, C.T. Bock, M. Kasner [et al.] // *Circulation*. — 2005. — №111. — P. 879–886.

91. High incidence of parvovirus B19 DNA in synovial tissue of patients with undifferentiated mono- and oligoarthritis / H.D. Stahl, B. Seidl, B. Hubner [et al.] // *Clin Rheumatol*. — 2000. — №19. — P. 281–286.

92. How many times can parvovirus B19-related anemia recur in solid organ transplant recipients? / C. Gosset, D. Viglietti, K. Hue [et al.] // *Transpl Infect Dis*. — 2012. — 14(5). — P. 64–70.

93. Human parvovirus arthropathy / D.G. White, A.D. Woolf, P.P. Mortimer [et al.] // *Lancet*. — 1985. — 1 (8426). — P. 419–421.

94. Human parvovirus B19 associated dilated cardiomyopathy / P. Jain, A. Jain, D.N. Khan, M. Kumar // *BMJ Case Rep*. — 2013. — Текст: электронный. — URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3762240/> (дата обращения: 15.11.2019).

95. Human Parvovirus B19 and blood product safety: a tale of twenty years of improvements / G. Marano, S. Vaglio, S. Pupella [et al.] // *Blood Transfus.* — 2015 Apr. — №13(2). — P. 184–196.

96. Human parvovirus B19 DNA replication induces a DNA damage response that is dispensable for cell cycle arrest at phase G2/M / S. Lou, Y. Luo, F. Cheng [et al.] // *J Virol.* — 2012 Oct. — №86(19). — P. 10748–10758.

97. Human parvovirus B19 in bone marrows from adults with acquired immunodeficiency syndrome: a comparative study using in situ hybridization and immunohistochemistry / W. Liu, M. Ittmann, J. Liu [et al.] // *Hum Pathol.* — 1997. — №28. — P. 760–766.

98. Human parvovirus B19 infection in pregnancy: should screening be offered to the low-risk population? / S.F. Wong, F.Y. Chan, R.B. Cincotta, M. Tilse // *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* — 2002. — №42. — P. 347–351.

99. Human parvovirus B19-induced acquired pure amegakaryocytic thrombocytopenia / J. Bhattacharyya, R. Kumar, S. Tyagi [et al.] // *Br J Haematol.* — 2005. — №128. — P. 128–129.

100. Human parvovirus B19 induced apoptotic bodies contain altered self-antigens that are phagocytosed by antigen presenting cells / K. Thammasri, S. Rauhamäki, L. Wang [et al.] // *PLoS One*, 2013. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3680405/>(дата обращения: 15.11.2019).

101. Human parvovirus B19 nosocomial outbreak in healthcare personnel in a paediatric ward at a national tertiary referral centre in Thailand / S.S. Sungkate, W. Sungkatea, S. Phongsamarta [et al.] // *Journal of Hospital Infection.* — 2017. — 96 (2). — P. 163–167.

102. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells / S. Moffatt, N. Yaegashi, K. Tada [et al.] // *J Virol.* — 1998. — №72. — P. 3018–3028.

103. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G (1) phase / E. Morita, A. Nakashima, H. Asao [et al.] // *J Virol.* — 2003. — №77(5). — P. 2915–2921.

104. Human parvoviruses B19, PARV4 and bocavirus in pediatric patients with allogeneic hematopoietic SCT / J. Rahiala, M. Koskenvuo, P. Norja [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* — 2013. — 48(10). — P. 1308–1312.

105. Human Parvovirus B19 Utilizes Cellular DNA Replication Machinery for Viral DNA Replication / W. Zou, Z. Wang, M. Xiong [et al.] // *J Virol.* — 2018. — 92(5). — Текст: электронный. — URL: <https://jvi.asm.org/content/jvi/92/5/e01881-17.full.pdf> (дата обращения: 15.07.2020).

106. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae / S.F. Cotmore, M. Agbandje-McKenna, M. Canuti [et al.] // *Journal of General Virology.* — 2019. — 100(3). — P. 367–368.

107. Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland / P. Grabarczyk, A. Kalińska, M. Kara [et al.] // *J Med Virol.* — 2011. — 83(1). — P. 142–149.

108. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study / P.A. Maple, L. Hedman, P. Dhanilall [et al.] // *J Clin Microbiol.* — 2014. — №52. — P. 947–956.

109. Identification of recombination in the NS1 and VPs genes of parvovirus B19 / H. Shen, W. Zhang, H. Wang, S. Shao // *J Med Virol.* — 2016. — 88(8). — P. 1457–1461.

110. Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy / E. Miller, C.K. Fairley, B.J. Cohen, C. Seng // *Br J Obstet Gynaecol.* — 1998. — №105. — P. 174–178.

111. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study / P.A. Maple, L. Hedman, P. Dhanilall [et al.] // *J Clin Microbiol.* — 2014. — №52. — P. 947–956.

112. In-hospital morbidity and mortality due to malaria-associated severe anaemia in two areas of Malawi with different patterns of malaria infection / L. Slutsker, T.E. Taylor, J.J. Wirima, R.W. Steketee // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. — 1994. — №88. — P. 548–551.

113. Intrahepatic long-term persistence of parvovirus B19 and its role in chronic viral hepatitis / C. Wang, A. Heim, V. Schlaphoff [et al.] // *J Med Virol*. — 2009. — №81. — P. 2079–2088.

114. Invernizzi R. Pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in a heart transplant recipient / R. Invernizzi, R. Bastia, F. Quaglia // *Clin Case Rep*. — 2016. — №4. — P. 870–871.

115. Isolated hypoplasia of abdominal wall muscles associated with fetal ascites / L. Travan, S. Naviglio, G. Cont [et al.] // *Congenit Anom*. — 2016. — №56. — P. 184–186.

116. Jain A. Genotypes of erythrovirus B19, their geographical distribution & circulation in cases with various clinical manifestations / A. Jain, R. Kant // *Indian J Med Res*. — 2018. — 147(3). — P. 239–247.

117. Juhl D. Parvovirus B19: What Is the Relevance in Transfusion Medicine? / D. Juhl, H. Hennig // *Front Med (Lausanne)*. — 2018. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5799219/> (дата обращения: 19.12.2019).

118. Kaufmann B. The structure of human parvovirus B19 / B. Kaufmann, A. Simpson, M. Rossmann // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2004. — 101(32). — P. 11628–11633.

119. Kerr J.R. A review of blood diseases and cytopenias associated with human parvovirus B19 infection / J.R. Kerr // *Rev Med Virol*. — 2015. — 25(4). — P. 224–240.

120. Kerr J.R. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of autoimmunity and autoimmune disease / J.R. Kerr // *J Clin Pathol*. — 2016. — 69(4). — P. 279–291.

121. Kishore J. Fatal missed case of hemophagocytic lymphohistiocytosis co-infected with parvovirus b19 and epstein barr virus in an infant: Test hyperferritinemia early / J. Kishore, D. Kishore // *Indian J Med Microbiol.* — 2014. — №32. — P. 181–183.

122. Kishore J. Serological study on parvovirus B19 infection in multitransfused thalassemia major patients and its transmission through donor units / J. Kishore, M. Srivastava, N. Choudhury // *Asian J Transfus Sci.* — 2011. — 5(2). — P. 140–143.

123. Kishore J. Serological study of parvovirus B19 infection in women with recurrent spontaneous abortions / J. Kishore, I. Gupta // *Indian J Pathol Microbiol.* — 2006. — №49. — P. 548–550.

124. Kontermann R.E. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies / R.E. Kontermann // *Biodrugs.* — 2009. — №23(2). — P. 93–109.

125. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection / Y. Munakata, T. Saito-Ito, K. Kumura-Ishii [et al.] // *Blood.* — 2005. — №106. — P. 3449–3456.

126. Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution.* — 2016. — 33 (7). — P. 1870–1874

127. Li L. Parvoviral left-end hairpin ears are essential during infection for establishing a functional intranuclear transcription template and for efficient progeny genome encapsidation / L. Li, S.F. Cotmore, P. Tattersall // *J Virol.* — 2013. — 87(19). — P.10501–10514.

128. Limits of sequencing and phylogenetic analysis to assess B19V transmission by single-donor blood component / A. Servant-Delmas, S. Laperche, M. Mercier [et al.] // *Vox Sang.* — 2011. — 100(2). — P. 254–255.

129. Look-back study on recipients of Parvovirus B19 (B19V) DNA-positive blood components / D. Juhl, M. Özdemir, J. Dreier [et al.] // *Vox Sang.* — 2015. — 109(4). — P. 305–311.

130. Low-level DNAemia of parvovirus B19 (genotypes 1-3) in adult transplant recipients is not associated with anaemia / A. Plentz, M. Würdinger, M. Kudlich, S. Modrow // *J Clin Virol.* — 2013 — 58(2). — P. 443–448.

131. Low prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Singapore / Y. Matsunaga, K.T. Goh, E. Utagawa, N. Muroi // *Epidemiol Infect.* — 1994. — №113. — P. 537–540.

132. Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19 / A. von Poblitzki, C. Gerdes, U. Reischl [et al.] // *J Virol.* — 1996. — №70. — P. 7327–7330.

133. Management of persistent B19 parvovirus infection in AIDS / B. Ramratnam, A. Gollerkeri, F.J. Schiffman [et al.] // *Br J Haematol.* — 1995. — №91. — P. 90–92.

134. Manaresi E. Advances in the Development of Antiviral Strategies against Parvovirus B19 / E. Manaresi, G. Gallinella // *Viruses.* — 2019 — 11 (7): 659. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669595/> (дата обращения: 15.10.2019).

135. Means R.T. Jr. Pure red cell aplasia /R.T. Means Jr. // *Blood.* — 2016. — 128 (21) — P.2504–2509.

136. Meningoencephalitis with persistent parvovirus B19 infection in an apparently healthy woman / F. Bonvicini, G. Marinacci, M.C. Pajno [et al.] // *Clin Infect Dis.* — 2008. — №47. — P. 385–387.

137. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity / N. Zhi, I.P. Mills, J. Lu [et al.] // *J Virol.* — 2006. — 80(12) — P. 5941–5950.

138. Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil / R.C. Cubel Garcia, R.F. Pereira, K.M. Azevedo [et al.] // *Braz J Infect Dis.* — 2017. — 1(1). — P. 102–106.

139. Mortimer P.P. Hypothesis: the aplastic crisis of hereditary spherocytosis is due to a single transmissible agent / P.P. Mortimer // *J Clin Pathol.* — 1983. — №36. — P. 445–448.

140. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA / E.L. Durigon, D.D. Erdman, G.W. Gary [et al.] // *Journal of Virological Methods.* — 1993. — №44. — P. 155–165.

141. Myocardial parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure / G.C. Stewart, J. Lopez-Molina, R.V. Gottumukkala [et al.] // *Circ Heart Fail.* — 2011. — 4(1). — P.71–78.

142. Naides S.J. Transient rheumatoid factor positivity in acute human parvovirus B19 infection / S.J. Naides, E.H. Field // *Arch Intern Med.* — 1988. — №148. — P. 2587–2589.

143. Neurological aspects of human parvovirus B19 infection: a systematic review / F. Barah, S. Whiteside, S. Batista, J. Morris // *Rev Med Virol.* — 2014. — №24(3). — P. 154–168.

144. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions / T. Saikawa, S. Anderson, M. Momoeda [et al.] // *J. Virol.* — 1993. — №67. — P. 3004–3009.

145. No evidence of persistent parvovirus B19 viremia among Iranian patients with HIV after a 1-year follow-up / A. Aghakhani, M. Mohraz, K. Azadmanesh [et al.] // *Archives of Virology.* — 2016. — 161. — P. 1183–1187

146. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3 / U. Raab, K. Beckenlehner, T. Lowin [et al.] // *Virology.* — 2002. — №293. — P. 86–93.

147. Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of Parvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products: guidance for Industry / US Food & Drug Administration. — 2009. — Текст: электронный. — URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nucleic-acid-testing-reduce-possible-risk-parvovirus-b19-transmission-plasma-derived-products> (дата обращения: 15.02.2020).

148. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis / R.O. Shade, H.C. Blundell, S.F. Cotmore [et al.] // *Journal of Virology.* — 1986. — №58. — P. 921–936.

149. Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011 / I. Mihály, A. Trethon, Z. Arányi [et al.] // *Orvosi Hetilap.* — 2012. — №153(49). — P. 1948–1957.

150. Outbreak of parvovirus B19 infection among anesthesiology and surgical fellows / R. Lara-Medrano, M.F. Martínez-Reséndez, E. Garza-González [et al.] // *J Infect Control*. — 2016. — 44 (9). — P. 1069–1070.

151. Parvovirus b19 associated hepatitis / C. Bihari, F. Rastogi, P. Saxena [et al.] // *Hepat Res Treat*. — 2013. — Текст: электронный. — URL: <https://europepmc.org/article/pmc/3819764> (дата обращения: 15.10.2019).

152. Parvovirus B19 at the culprit coronary stenosis predicts outcome after stenting / G. Niccoli, A. Severino, M. Pieroni [et al.] // *Eur J Clin Invest*. — 2014. — №44. — P. 209–218.

153. Parvovirus B19V DNA contamination in Chinese plasma and plasma derivatives / W. Zhang, L. Ke, L. Changqing [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. — 2012. — 10: 194. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3515499/> (дата обращения: 17.12.2019).

154. Parvovirus B19 infection in pregnancy: maternal and fetal viral load measurements related to clinical parameters / T.R. de Haan, M.F. Beersma, D. Oepkes [et al.] // *Prenat Diagn*. — 2007. — №27. — P. 46–50.

155. Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases / A.J. Eid, R.A. Brown, R. Patel, R.R. Razonable // *Clin Infect Dis*. — 2006. — 43(1). — P. 40–48.

156. Parvovirus B19 infection and severe anaemia in Kenyan children: a retrospective case control study / J. Wildig, Y. Cossart, N. Peshu [et al.] // *BMC Infect Dis*. — 2010. — №10. — P. 88.

157. Parvovirus B19 infection contributes to severe anemia in young children in Papua New Guinea / J. Wildig, P. Michon, P. Siba [et al.] // *J Infect Dis*. — 2006. — 194(2). — P. 146–153.

158. Parvovirus B19 infection in children with acute lymphoblastic leukemia is associated with cytopenia resulting in prolonged interruptions of chemotherapy / A. Lindblom, M. Heyman, I. Gustafsson [et al.] // *Clin Infect Dis*. — 2008. — №46. — P. 528–536.

159. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / I.V. Khamitova, I.N. Lavrentyeva, M.Yu. Averyanova [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation. — 2018.— 7 (1). — P. 36–43.

160. Parvovirus B19 infection in a hypogammaglobulinemic infant with neurologic disorders and anemia: successful immunoglobulin therapy / G. Nigro, P. D'Eufemia, M. Zerbini [et al.] // *Pediatr Infect Dis J.* — 1994. — №13. — P. 1019–1021.

161. Parvovirus B19V infection in Israel: prevalence and occurrence of acute infection between 2008 and 2013 / O. Mor, I. Ofir, R. Pavel [et al.] // *Epidemiol Infect.* — 2016. — 144(1). — P. 207–214.

162. Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection, and maternal risk of infection / J. Mossong, N. Hens, V. Friederichs [et al.] // *Epidemiology and Infection.* — 2008. — 136(8). — P. 1059–1068.

163. Parvovirus b19 infection in pediatric patients with hematological disorders / L. Singhal, B. Mishra, A. Trehan [et al.] // *J Glob Infect Dis.* — 2013. — 5(3). — P. 124.

164. Parvovirus B19 integration into human CD36+ erythroid progenitor cells / T. Janovitz, S. Wong, N. S. Young [et al.] // *Virology* — 2017. — V. 511 — P. 40–48.

165. Parvovirus B19-induced severe anemia in heart transplant recipients: Case report and review of the literature / N.C. Pinto, C. Newman, C.A. Gomez [et al.] // *Clin Transplant*, 2019. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6850585/pdf/CTR-33-na.pdf/> (дата обращения: 14.03.2020).

166. Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples / Yu MY, H.J. Alter, M.L. Virata-Theimer [et al.] // *Transfusion.* — 2010. — 50(8). — 1712–1721.

167. Parvovirus B19 may have a role in the pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis / B. Gonzalez, C. Larranaga, O. Leon [et al.] // *J Rheumatol.* — 2007. — №34. — P. 1336–1340.

168. Parvovirus B19 profiles in patients presenting with acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy / F. Escher, S. Modrow, T. Sabi [et al.] // *Med Sci Monit.* — 2008. — №14. — P. 589–597.

169. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: A possible pathogenetic role in scleroderma / C.M. Magro, G. Nuovo, C. Ferri [et al.] // *J Cutan Pathol.* — 2004. — №31. — P. 43–50.

170. Parvovirus B19 replication and expression in differentiating erythroid progenitor cells / G. Bua, E. Manaresi, F. Bonvicini, G. Gallinella // *PLoS One.* — 2016. — №11(2). — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4742074/> (дата обращения: 15.10.2019).

171. Parilla B.V. Association of parvovirus infection with isolated fetal effusions / B.V. Parilla, R.K. Tamura, N.A. Ginsberg // *Am J Perinatol.* — 1997. — №14. — P. 357–358.

172. Paver W.K. Letter: Parvovirus-like particles in human sera / W.K. Paver, E.O. Caul, S.K. Clarke // *Lancet.* — 1975. — 1 (7900). — P. 232–232.

173. Paver W.K. Comparison of human fecal and serum parvo-like viruses / W.K. Paver, S.K. Clarke // *J. Clin. Microbiol.* — 1976 Jul. — №4(1). — P. 67–70.

174. Parvovirus-Like Particles In Human Sera / Y.E. Cossart, B. Cant, A.M. Field, D. Widdows // *The Lancet.* — 1975 Jan. — 305 (7898) — P. 72–73.

175. Persistent and prolonged parvovirus B19 viremia in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia / S.A. Fritch Lilla, S.E. Burgett, K.A. McGann, D.S. Wechsler // *J Pediatric Infect Dis Soc.* — 2015. — №4. — P. 38–40.

176. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS / N. Frickhofen, J.L. Abkowitz, M. Safford [et al.] // *Ann Intern Med.* — 1990.— №113. — P. 926–933.

177. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. / L.A. Adamson-Small, I.V. Ignatovich, M.G. Laemmerhirt, J.A. Hobbs // *Virus Res.* — 2014. — № 190. — P. 8–16.

178. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues / M. Soderlund-Venermo, K. Hokynar, J. Nieminen [et al.] // *Pathol Biol (Paris).* — 2002. — 50 (5). — P. 307–316.

179. Persistent symptomatic parvovirus B19 infection with severe thrombocytopenia transmitted by red blood cell transfusion containing low parvovirus B19 DNA levels / K. Nagaharu, Y. Sugimoto, Y. Hoshi [et al.] // *Transfusion*. — 2017. — №57(6). — P. 1414–1418.

180. Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19 / G. Pasquinelli, F. Bonvicini, L. Foroni [et al.] // *J Clin Virol*. — 2009. — 44(1). — P. 33–38.

181. Plasmodium falciparum malaria and Parvovirus B19; a case of acute co-infection / F. Ingrassia, A. Gadaleta, P. Maggi, G. Pastore // *BMC Infect Dis*. — 2010. — №10. — P. 87.

182. Poole B.D. Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes / B.D. Poole, Y.V. Karetnyi, S.J. Naides // *J. Virol*. — 2004. — №78. — P. 7775–7783.

183. Postinfectious glomerulonephritis secondary to erythrovirus B19 (Parvovirus B19): Case report and review of the literature / H. Marco, I. Guermah, L. Matas [et al.] // *Clin Nephrol*. — 2016. — №85. — P. 238–244.

184. Prasad B. Parvovirus leading to thrombotic microangiopathy in a healthy adult / B. Prasad, J. Stonge // *BMJ Case Rep*. — 2016. — Текст: электронный. — URL: [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735274/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735274/) (дата обращения: 15.12.2019).

185. Prevalence and genotypic characterization of Human Parvovirus B19 in children with measles- and rubella-like illness in Iran / F. Rezaei, B. Sarshari, N. Ghavami [et al.] // *J Med Virol*. — 2016. — 88(6). — P. 947–953.

186. Prevalence of parvovirus B19 infection in patients infected with human immunodeficiency virus / A. M. van Elsacker-Neile, F. P. Kroon, M. E. van der Ende [et al.] // *Clin Infect Dis*. — 1996. — 23(6). — P. 1255–1260.

187. Prevalence of parvovirus B19 DNA in bone marrow of patients with haematological disorders / A. Lundqvist, T. Tolfvenstam, M. Brytting [et al.] // *Scand J Infect Dis*. — 1999. — №31(2). — P. 119–122.

188. Profound sustained reticulocytopenia and anaemia in an adult patient with sickle cell disease / N. Win, E. Lee, M. Needs [et al.] // *Transfus Med*. — 2014. — №24. — P. 418–420.

189. Prolonged remission in a child with chronic myeloid leukemia following Parvo virus B19 (B19V) infection / A. Kumar, N.R. Moulik, J. Kishore [et al.] // *Indian J Med Microbiol.* — 2015. — №33. — P. 432–434.

190. Pseudo-erysipelas: A new atypical cutaneous manifestation of parvovirus B19 primary infection / I. Kechaou, E. Cherif, I. Boukhris [et al.] // *Med Mal Infect.* — 2016. — №46. — P. 107–108.

191. Qiu J. Human Parvoviruses / J. Qiu, M. Söderlund-Venermo, N.S. Young // *Clin Microbiol Rev.* — 2017. — №30(1). — P. 43–113.

192. Rapid sequence change and geographical spread of human parvovirus B19: comparison of B19 virus evolution in acute and persistent infections / P. Norja, A.M. Eis-Hübinger, M. Söderlund-Venermo [et al.] // *J Virol.* — 2008. — №82. — P. 6427–6433.

193. Reconstituted immunity against persistent parvovirus B19 infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after highly active antiretroviral therapy / M.Y. Chen, C.C. Hung, C.T. Fang, S.M. Hsieh // *Clin Infect Dis.* — 2001. — №32. — P. 1361–1365.

194. Recurrent erythema in patients with long-term parvovirus B19 infection / M. Musiani, E. Manaresi, G. Gallinella [et al.] // *Clin. Infect.* — 2005. — №40. — P. 117–119.

195. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products / M.K. Hourfar, U. Mayr-Wohlfart, A. Themann [et al.] // *Transfusion.* — 2011. — 51(1). — P. 129–136.

196. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2 / Y. Fu, K.K. Ishii, Y. Munakata [et al.] // *J Virol.* — 2002. — №76. — P. 5395–5403.

197. Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases / G. Gallinella, E. Zuffi, G. Gentilomi [et al.] // *J Med Virol.* — 2003. — №71. — P. 135–139.

198. Rivas-Delgado A. Recurrent pure red cell aplasia in a hepatorenal transplant recipient with chronic parvovirus B19 infection / A. Rivas-Delgado, E. Matutes, M.

Rozman // *Br J Haematol*, 2016. — Текст: электронный. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/bjh.13813/> (дата обращения: 24.12.2019)

199. RNA Binding Protein RBM38 Regulates Expression of the 11-Kilodalton Protein of Parvovirus B19, Which Facilitates Viral DNA Replication / S.S. Ganaie, A.Y. Chen, C. Huang [et al.] // *Viol.* — 2018. — 92(8). — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874399/> (дата обращения: 15.01.2020).

200. Rogo LD Human parvovirus B19: a review / L.D. Rogo, T. Mokhtari-Azad, M.H. Kabir, F. Rezaei // *Acta Virol.* — 2014. — 58(3). — P. 199–213.

201. Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells / A.Y. Chen, W. Guan, S. Lou [et al.] // *J Virol.* — 2010. — №84. — P. 12385–12396.

202. Schwarz T.F. Case report: detection of parvovirus B19 in a skin biopsy of a patient with erythema infectiosum / T.F. Schwarz, S. Wiersbitzky, M. Pambor // *J Med Virol.* — 1994. — №43. — P. 171–174.

203. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations // World Health Organization. — Geneva, 2009. — Текст: электронный. — URL: <https://www.who.int/bloodsafety/ScreeningTTI.pdf> (дата обращения: 15.11.2019).

204. Seroepidemiology of parvovirus B19 among different age groups & pregnant women in India / R. Viswanathan, B.V. Tandale, M.S. Tamayachekar [et al.] // *Indian J Med Res.* — 2017. — 146(1). — P. 138–140.

205. Seroepidemiological study of human parvovirus B19 among human immunodeficiency virus-infected patients in a medium-sized city in Rio de Janeiro, Brazil / K.M. Azevedo, S. Setúbal, L.A. Camacho [et al.] // *Mem Inst Oswaldo Cruz.* — 2009. — 104(6). — P. 901–904

206. Servey J.T. Clinical presentations of parvovirus B19 infection / J.T. Servey, B.V. Reamy, J. Hodge // *Am. Fam. Physician.* — 2007. — №75. — P. 373–376.

207. Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya / C.R. Newton, P.A. Warn, P.A. Winstanley [et al.] // *Trop. Medicine & International Health*. — 1997. — №2(2). — P. 165–178.

208. Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: a case–control etiologic study / L. Manning, M. Laman, A. Rosanas-Urgell [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis*. — 2012. — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3521670/pdf/pntd.0001972.pdf>/ (дата обращения: 24.12.2019).

209. Severe bone marrow failure associated with human parvovirus B19 infection in a case with no underlying disorder / C. Kawakami, Y. Kono, A. Inoue [et al.] // *Int J Hematol*. — 2012. — №96. — P. 820–821.

210. Shackelton L.A. Phylogenetic Evidence for the Rapid Evolution of Human B19 Erythrovirus / L.A. Shackelton, E.C. Holmes // *J Virol*. — 2006. — 80(7). — P. 3666–3669.

211. Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection / A. Lindblom, A. Isa, O. Norbeck [et al.] // *Clin Infect Dis*. — 2005. — №41. — P. 1201–1203.

212. Status of immunity against PVB19 in HIV-infected patients according to CD4(+) cell count, and antiretroviral therapy regimen groups / A. Abdollahi, S. Shoar, S. Sheikhabaei [et al.] // *Niger Med J*. — 2014. — 55(1). — P. 20–23.

213. Substitution rate and natural selection in parvovirus B19 // G.G. Stamenković, V.C. Ćirković, M.M. Šiljić [at al.] / *Sci Rep*. — 2016. — 24(6). — Текст: электронный. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075947> (дата обращения: 23.08.2020).

214. Sun L. Acute fulminant hepatitis with bone marrow failure in an adult due to parvovirus B19 infection / L. Sun L, J.C. Zhang // *Hepatology*. — 2012. — №55. — P. 329–330.

215. Sustained CD8+ T-cell responses induced after acute parvovirus B19 infection in humans / O. Norbeck, A. Isa, C. Pohlmann [et al.] // *J Virol*. — 2005. — №79. — P. 12117–12121.

216. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion / M. Satake, Y. Hoshi, R. Taira [et al.] // *Transfusion*. — 2011. — 51(9). — P. 1887–1895.

217. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world / H.A. Kelly, D. Siebert, R. Hammond [et al.] // *Epidemiology and Infection*. — 2000. — 124 (3). — P. 449–457.

218. The effects of co-infection with human parvovirus B19 and *Plasmodium falciparum* on type and degree of anaemia in Ghanaian children / K.O. Duedu, K.W. Sagoe, P.F. Ayeh-Kumi [et al.] // *Asian Pac J Trop Biomed*. — 2013. — 3(2). — P. 129–139.

219. The family Parvoviridae / S.F. Cotmore, M. Agbandje-McKenna, J.A. Chiorini [et al.] // *Arch Virol*. — 2014. — №159. — P. 1239–1247.

220. The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus / W. Guan, S. Wong, N. Zhi, J. Qiu // *J. Virol*. — 2009. — №83. — P. 9541–9553.

221. The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal hydrops: A systematic review and meta-analysis / Y.Q. Xiong, J. Tan, Y.M. Liu [et al.] // *J. Clin. Virol*. — 2019. — №114. — P. 12–20.

222. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells / A.Y. Chen, E.Y. Zhang, W. Guan [et al.] // *Blood*. — 2010. — 115 (5). — P. 1070–1080.

223. The ZKRD: The German National Bone Marrow Donor Registry: [официальный сайт]. – URL: <https://www.zkrd.de> (дата обращения: 25.01.2020).

224. Thompson J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson // *Nucleic Acids Res*. — 1994. — V. 22, №22. — P. 4673–4680.

225. Transient leukoerythroblastosis in a very low birth weight infant with parvovirus B19 infection / R. Duran, U. Vatansever, B. Acunas [et al.] // *Int J Infect Dis.* — 2009. — №13. — P. 473–475.

226. Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions / T. Pozzuto, K. von Kietzell, T. Bock // *Virology.* — 2011. — V. 411. — P. 50–64.

227. Transition from endocapillary proliferative glomerulonephritis to membranoproliferative glomerulonephritis in a patient with a prolonged human parvovirus B19 infection / T. Uchida, T. Oda, A. Watanabe [et al.] // *Clin Nephrol.* — 2014. — №82. — P. 62–67.

228. Viruses with a Single-Stranded DNA Genome // *Molecular Virology* / S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl // Heidelberg: Springer, 2013. — P. 875–918.

229. Viral-associated haemophagocytosis with parvovirus-B19-related pancytopenia / K. Muir, W.T. Todd, W.H. Watson, E. Fitzsimons // *Lancet.* — 1992. — №339. — P. 1139–1140.

230. Visualization of the externalized VP2 N termini of infectious human parvovirus B19 / B. Kaufmann, P.R. Chipman, V.A. Kostyuchenko [et al.] // *J Virol.* — 2008. — 82(15). — P. 7306–7312.

231. Watanabe T. Acute encephalitis and encephalopathy associated with human parvovirus B19 infection in children / T. Watanabe, H. Kawashima // *World J Clin Pediatr.* — 2015. — №4. — P. 126–134.

232. Waldman M. Parvovirus B19 and the kidney / M. Waldman, J.B. Kopp // *Clin J Am Soc Nephrol.* — 2007. — №2. — P. 47–56.

233. Weigel-Kelley K.A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry / K.A. Weigel-Kelley, M.C. Yoder, A. Srivastava // *Blood* — 2003. — №102. — P. 3927–3933.

234. World Malaria Report 2018 // World Health Organization. — Geneva, 2018. — Текст: электронный. — URL: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/275867> (дата обращения: 23.04.2020).

235. Würdinger M. Impact of Parvovirus B19 Viremia in Liver Transplanted Children on Anemia: A Retrospective Study / M. Würdinger, S. Modrow, A. Plentz // *Viruses*. — 2017. — 9(6). — P. 149.

236. Yaguchi D. Three adult cases of HPV-B19 infection with concomitant leukopenia and low platelet counts / D. Yaguchi, N. Marui, M. Matsuo // *Clin Med Insights Case Rep*. — 2015. — №8. — P. 19–22.