

УДК616.34-002.1:578.835]-076(476)

## ПАРЭХОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

<sup>1</sup>Т. В. Амвросьева (amvrosieva@gmail.com),<sup>1</sup>Н. В. Поклонская (labsanvir@gmail.com), <sup>1</sup>Ю. А. Шилова (labsanvir@gmail.com),<sup>2</sup>Н. Л. Ключико (4444nina@mail.ru), <sup>2</sup>Е. В. Бобич (gulenko@tut.by)<sup>1</sup> Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
Минск, Беларусь<sup>2</sup> Городская детская инфекционная больница, Минск, Беларусь

*Введение.* Парэховирусы (ПЭВ) – широко распространенные РНК-содержащие вирусы, обнаруживаемые у пациентов с инфекционными заболеваниями пищеварительной системы. Системных исследований по проблеме парэховирусной инфекции в Республике Беларусь ранее не было, данные о ее распространенности и о циркулирующих возбудителях отсутствовали.

*Цель исследования* – анализ результатов генодиагностики ПЭВИ у пациентов с инфекционной патологией желудочно-кишечного тракта и изучение молекулярно-генетических характеристик ее возбудителей.

*Материал и методы.* Исследован клинический материал от 276 пациентов с признаками кишечной инфекции, собранный в 2016-2018 гг. Детекцию ПЭВ осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ, генотипирование – методом секвенирования участка гена VP1 ПЭВ.

*Результаты.* По результатам проведенной генодиагностики парэховирусная инфекция выявлена у 4,7% обследованных пациентов. Все генотипированные изоляты принадлежали 1 типу.

*Заключение.* В этиологическую структуру регистрируемых в Республике Беларусь кишечных вирусных инфекций определен вклад вносят ПЭВ. Среди выявленных возбудителей кишечной формы парэховирусной инфекции идентифицированы ПЭВ 1 типа, которые характеризовались значительной гетерогенностью своей популяции.

**Ключевые слова.** Парэховирусы человека, генодиагностика, молекулярное типирование, острая кишечная инфекция, острый гастроэнтерит.

## HUMAN PARECHOVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH INFECTIOUS PATHOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTIC OF CAUSATIVE AGENTS

<sup>1</sup>T. V. Amvrosieva, <sup>1</sup>N. V. Paklonskaya, <sup>1</sup>Yu. A. Shilova, <sup>2</sup>N. L. Kliuiko, <sup>2</sup>E.V. Bobich<sup>1</sup>The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,  
Minsk, Belarus<sup>2</sup>City Children's Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

*Background.* Human parechoviruses (HPeVs) are widely distributed RNA viruses that are found in patients with infectious diseases of the digestive system. HPeV infection has not been diagnosed in the Republic of Belarus until now therefore information about its epidemiology was unavailable.

*Objective* is to study the results of detection and molecular typing of HPeV from patients with infectious pathology of the gastrointestinal tract.

*Materials and methods.* Clinical material from 276 patients with signs of gastroenteritis, collected in 2016–2018 years, was studied. Detection of HPeV was performed by RT-qPCR, while genotyping - by sequencing the VP1 gene.

*Results.* HPeV infection was detected in 4.7% of the examined patients. Sequence analyses showed that all HPeV isolates belonged to type 1.

*Conclusion.* HPeV makes a contribution to the etiological structure of intestinal viral infections registered in the Republic of Belarus. The population of HPeV-1 identified from the patients with gastroenteritis was characterized by considerable heterogeneity.

**Keywords.** Human parechoviruses (HPeVs), gene diagnostics, molecular typing, acute enteric infection, acute gastroenteritis.

### Введение

Парэховирусы человека (ПЭВ) – РНК-содержащие вирусы из семейства Picornaviridae – широко распространены по всему миру [1]. На сегодняшний день идентифицировано 19 серотипов ПЭВ, наиболее часто встречающимся из которых является ПЭВ 1 типа (ПЭВ 1) [1, 2, 3]. Парэховирусная инфекция (ПЭВИ) может сопровождаться разными клиническими проявлениями, начиная от кишечных и респираторных, вплоть до тяжелых нейроинфекций (энцефалит, менингит, острый вялый паралич) и фатальных сепсисоподобных заболеваний новорожденных. По последним данным, ПЭВИ может ассоциироваться также с рядом других патологий, включая острую печеночную недостаточность, гепатит, гемолитический уремический синдром, миокардит, миалгию, миозит, герпангину, апноэ, заболевание «рука, нога, рот», синдром внезапной детской смертности, синдром Рея [1, 3].

ПЭВ вызывают преимущественно спорадическую заболеваемость. Вместе с тем в зарубежной литературе описаны многочисленные факты связанной с ними вспышечной заболеваемости [4, 5] и даже эпидемий [6].

В Республике Беларусь ПЭВИ до недавнего времени относилась к числу малоизвестных и недиагностируемых инфекционных болезней. Системных исследований ранее в стране не проводилось. Данные о ее распространенности и циркулирующих возбудителях отсутствовали. Оставалась неизвестной также роль ПЭВ в формировании этиологической структуры регистрируемой в республике кишечной инфекционной заболеваемости, несмотря на то, что такая информация достаточно широко представлена в зарубежной литературе [7, 8, 9].

**Цель исследования** – анализ результатов генодиагностики ПЭВИ у пациентов с инфекционной патологией желудочно-кишечного тракта и изучение молекулярно-генетических характеристик ее возбудителей.

### Материалы и методы

Исследовались пробы (n=278) фекалий, крови, ликвора, смывов носоглотки от детей до 7 лет (n=276), полученные из разных учреждений здравоохранения Республики Беларусь с января 2016 г. по май 2018 г. с клиническими диагнозами «острая кишечная инфекция» (ОКИ), «острый гастроэнтерит»

(ОГЭ), «острый энтероколит», «острый энтерит», острая респираторная инфекция (ОРИ) с кишечным синдромом.

Выделение РНК из проб проводили с помощью набора «Рибопреп», («Амплисенс», Россия); постановку реакции обратной транскрипции – с использованием набора «РЕВЕРТА-L» («Амплисенс», Россия).

Индикацию ПЭВ выполняли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием взятых из литературных источников [10] и разработанных комплектов праймеров и зондов на амплификаторе Rotor Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия). Анализ в отношении других известных возбудителей ОКИ (кампилобактерии, аденовирусы гр. F, астровирусы и норовирусы 2 геноварианта) осуществляли методом ОТ-ПЦР с помощью набора реагентов «Амплисенс ОКИ-скрин-FL» (Россия).

Генотипирование обнаруженных ПЭВ проводили методом секвенирования продуктов ПЦР по методике, описанной ранее [11]. Молекулярное типирование выполняли с помощью программных продуктов, открытых для свободного использования – MEGA6 [12] и BLAST [13]. Для филогенетической реконструкции использовали метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), достоверность топологии полученного древа оценивали на основе бутстреппинга (проанализировано 500 псевдорепликатов).

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных генодиагностических исследований клинического материала (n=278) ПЭВ обнаружены в 4,7% проб (в 13 образцах фекалий). Среди пациентов с клиническими диагнозами ОКИ (n=106) и ОРИ с кишечным синдромом (n=50) ПЭВ определялись с частотой 6,6 и 6%, соответственно (рис. 1), у детей с клиническим диагнозом ОГЭ (n=107) – с

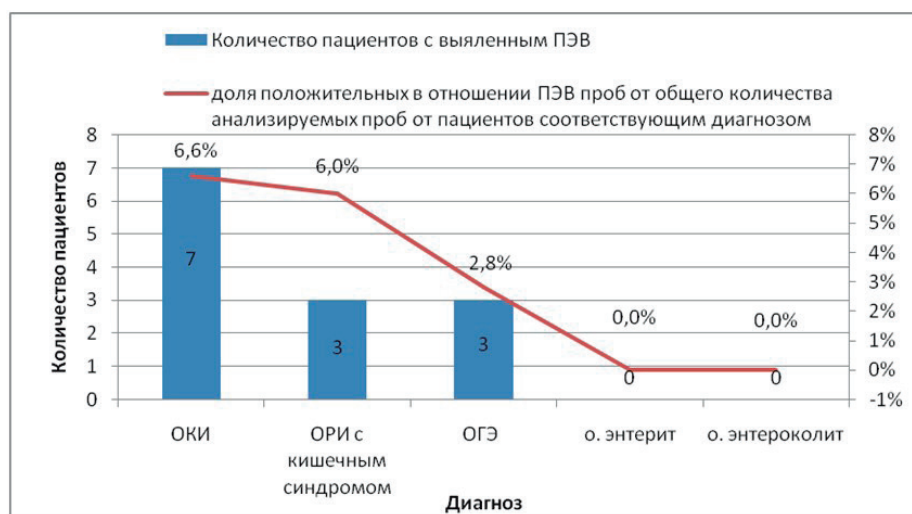


Рисунок 1. – Результаты детекции ПЭВ у пациентов с разными клиническими диагнозами

частотой 2,8%. При этом у пациентов с острым энтеритом (n=10) и острым энтероколитом (n=3) ПЭВ не выявлены.

Полученные нами результаты согласуются с опубликованными данными зарубежных исследователей. Так, в Северной Италии в 2015-2016 гг. ПЭВ обнаруживались в 2,6% фекалий от пациентов с ОГЭ [7]. В Нижнем Новгороде в течение 2006-2010 гг. данные возбудители были выявлены в 6,16% случаев регистрируемых ОКИ [8]. Проведенные в 2004 г. исследования немецких ученых установили наличие ПЭВ в клиническом материале 1,6% пациентов с кишечной инфекцией [9]. В зарубежной литературе также имеются данные о выявлении ПЭВ у пациентов с клиническими проявлениями ОРИ (1,3-9,0%) [14, 15].

При анализе возрастной структуры обследованных нами пациентов установлено, что наиболее часто ПЭВИ выявлялась у детей первых трех лет жизни (92%) (рис. 2). Полученный результат вполне логичен, исходя из известной информации о том, что ПЭВ – достаточно распространенные вирусные патогены, заражение ими может произойти в самом раннем возрасте. Об этом свидетельствуют результаты исследований норвежских ученых о выявлении данных возбудителей у 43% детей в возрасте до 12 месяцев и у 86% – до 24 месяцев жизни [16].

Все образцы, в которых обнаруживались ПЭВ, дополнительно исследовались на предмет выявления в них генетического материала других кишечных патогенов. Смешанное инфицирование ПЭВ с другими возбудителями имело место у 53,9% детей с ПЭВИ (у 7 из 13). Выявлены следующие сочетания кишечных патогенов: ПЭВ + норовирусы 2-й геногруппы (38,55%), ПЭВ + кампилобактерии (7,7%), ПЭВ + аденовирусы группы F (7,7%). Полученные результаты согла-

суются с данными ряда зарубежных исследователей, согласно которым частота детекции ПЭВ в сочетании с другими возбудителями колебалась в пределах 25,0-71,45% [7, 17].

Идентифицированные у пациентов ПЭВ далее были подвергнуты молекулярному типированию (генотипированию) с целью установления их типовой принадлежности. Для этого накапливали вирусные последовательности гена VP1 основного капсидного белка парэховирусов, который характеризуется максимальной вариабельностью и локализацией в нем основных антигенных детерминант, определяющих серотип возбудителя.

В результате выполненных исследований получены 9 нуклеотидных последовательностей ПЭВ, которые использованы для филогенетической реконструкции при проведении сравнительного биоинформационного анализа. Согласно полученным данным, все «белорусские» изоляты ПЭВ, выявленные у пациентов с клиническими проявлениями кишечных инфекций, принадлежали к 1 типу, что согласуется с литературными данными зарубежных авторов о преобладании ПЭВ 1 у пациентов с признаками кишечной инфекции [1].

В ходе проведенного филогенетического анализа ПЭВ, идентифицированных в наших исследованиях, установлено значительное генетическое разнообразие их популяции (рис. 3).

Три изолята в пределах данного типа формировали монофилетические кластеры с изолятами ПЭВ, циркулировавшими в других странах: изолят № 17159 формировал общий кластер с двумя изолятами, выделенными в 2012 г. в Тайване; изолят № 14879 – с выделенным в 2015 г. в Ю. Корею, и в 2014 г. – в Гонконге; № 14907 – с изолятами, выделенными в 2009 г. в Нидерландах и в 2015 г. – в Гонконге. При этом последние 2 изолята (№ 14879 и 14907) относились к генотипу HPeV1A, в пределах которого принадлежали к разным геновариантам вируса.

Еще 6 проанализированных изолятов ПЭВ 1 (№ 14908, 14830, 14788, 17171, 14840, 14952) не формировали общих кластеров ни с одной нуклеотидной последовательностью ПЭВ, представленных на текущий момент в базе данных GenBank. Максимальной степенью сходства между собой характеризовались

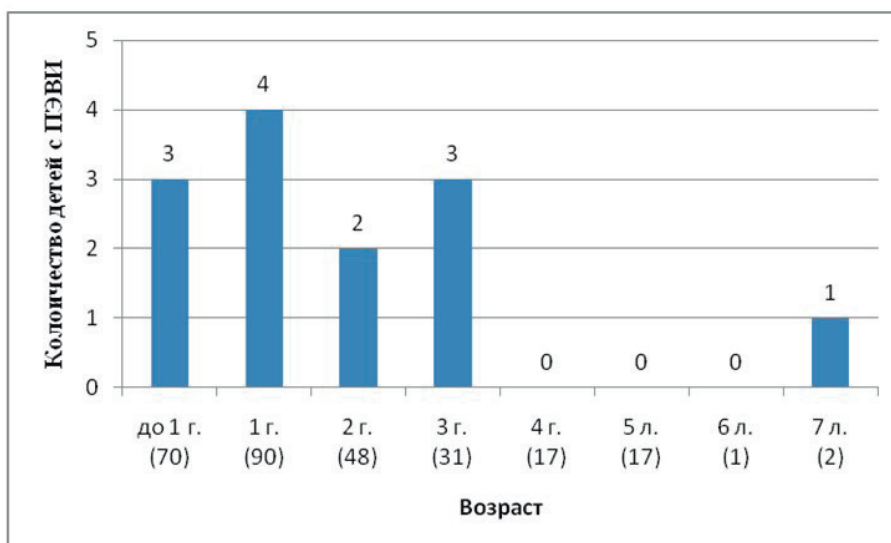


Рисунок 2. – Возрастная структура пациентов с ПЭВИ (в скобках приведено количество исследованных проб от пациентов соответствующего возраста)



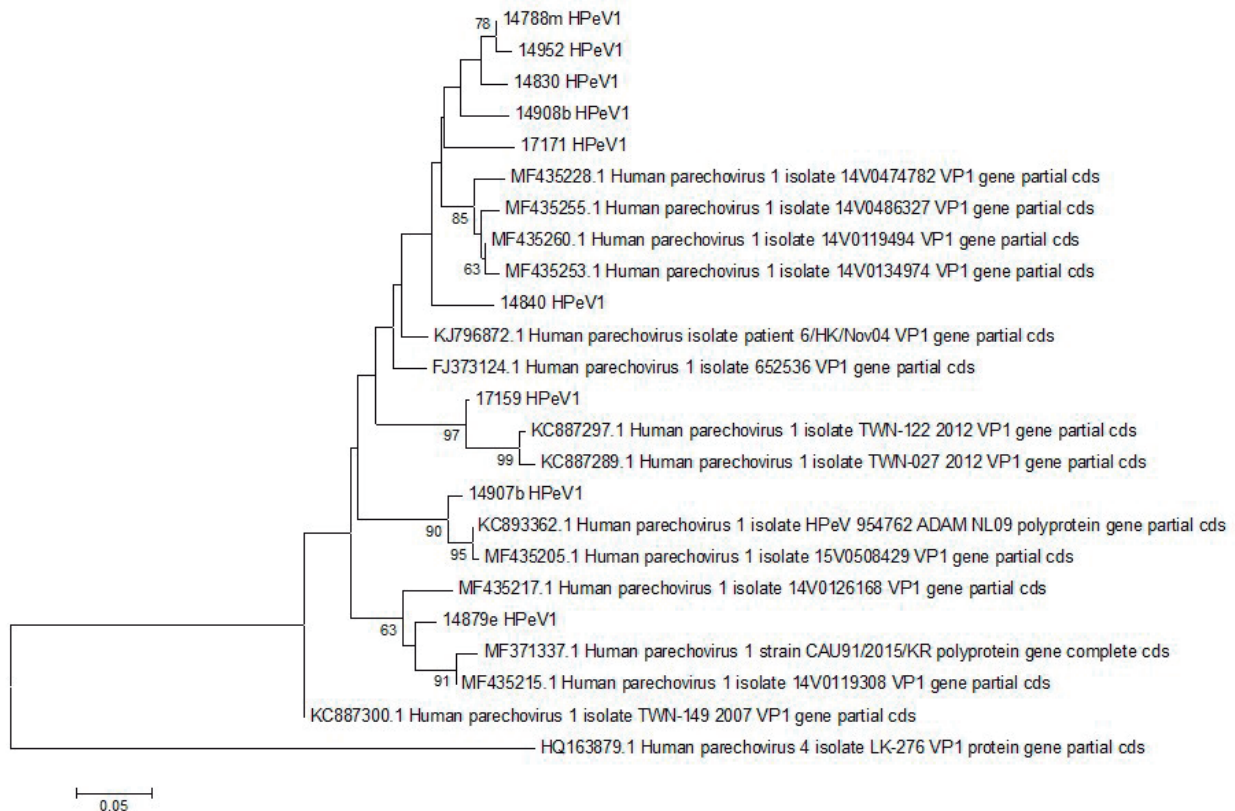


Рисунок 3. – Филогенетическая реконструкция по фрагменту гена VP1 ПЭВ методом Maximum Likelihood, модель эволюции TN93, гамма-распределение,  $\alpha=0,5$

изоляты № 14788, 14830, 14908 и 14952 (93,8-96,9%). При этом их степень сходства с нуклеотидными последовательностями всех остальных изолятов ПЭВ (№ 17159, 14879, 14907, 17171, 14840) составила 87,1-91,2%. На основании полученных данных можно предположить, что изоляты № 14788, 14830, 14908 и 14952 принадлежали к другому генотипу и/или геноварианту ПЭВ, однако выявить близкородственных им штаммов/изолятов на сегодняшний день не представилось возможным.

### Выводы

В этиологическую структуру регистрируемых в Республике Беларусь кишечных вирусных инфекций определенный вклад вносят ПЭВ, частота выявления которых в наших исследованиях составила 4,7%. Все идентифицированные возбудители принадлежали к типу ПЭВ 1. При этом

отдельные изоляты ПЭВ 1 характеризовались значительной гетерогенностью (до 22,9% различий в нуклеотидной последовательности гена VP1). Только 3 из выявленных «белорусских» изолятов ПЭВ 1 типа имели близкое генетическое родство с таковыми, представленными в международном GenBank, что обусловлено малой изученностью этих возбудителей в мировом масштабе.

Представленные результаты исследований, впервые проведенных в Республике Беларусь по проблеме ПЭВИ, указывают на актуальность и необходимость их продолжения в направлении расширения спектра изучаемых клинических форм пока недостаточно известной в нашей стране инфекционной патологии с детальным анализом молекулярно-эпидемиологических характеристик возбудителей.

### References

- Olijve L, Jennings L, Walls T. Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young Infants. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017;31(1):e00047-17. doi:10.1128/CMR.00047-17.
- Parechovirus [Internet]. Available from: <http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus.htm>.
- Shah G, Robinson JL. The particulars on parechovirus. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2014;25(4):186-188.
- Strenger V, Diedrich S, Boettcher S, Richter S, Maritschnegg P, Gangl D, Fuchs S, Grangl G, Resch B, Urlesberger B. Nosocomial Outbreak of Parechovirus 3 Infection among Newborns, Austria, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(9):1631-1634. doi: 10.3201/eid2209.151497.
- Ljubin-Sternak S, Juretić E, Šantak M, Pleša M, Forčić D,

- Vilibić-Čavlek T, Aleraj B, Mlinarić-Galinović G. Clinical and molecular characterization of a parechovirus type 1 outbreak in neonates in Croatia. *J. Med. Virol.* 2011;83(1):137-141. doi: 10.1002/jmv.21848.
6. Aizawa Y, Suzuki Y, Watanabe K, Oishi T, Saitoh A. Clinical utility of serum samples for human parechovirus type 3 infection in neonates and young infants: The 2014 epidemic in Japan. *J. Infect.* 2016;72(2):223-232. doi: 10.1016/j.jinf.2015.10.010.
  7. Biscaro V, Piccinelli G, Gargiulo F, Ianiro G, Caruso A, Caccuri F, De Francesco MA. Detection and molecular characterization of enteric viruses in children with acute gastroenteritis in Northern Italy. *Infect. Genet. Evol.* 2018;60:35-41. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.011.
  8. Golitsyna LN, Zverev VV, Novikova NA, Fomina SG, Parfenova OV, Epifanova NV, Lukovnikova LB, Morozova OV, Ponomareva NV. Obnaruzhenie, osobennosti cirkuljacji i raznoobrazie parjehovirusov cheloveka v Nizhnem Novgorode [Prevalence, Features of Circulation, and Diversity of Human Parechoviruses in Nizhny Novgorod]. *Voprosy virusologii* [Problems of Virology]. 2013;58(2):29-33. (Russian).
  9. Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C. Prevalence, Types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(1):242-248. doi:10.1128/JCM.01468-07.
  10. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(8):2519-2524. doi: 10.1128/JCM.00277-08.
  11. Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J. Clin. Virol.* 2010;48(3):202-207. doi: 10.1016/j.jcv.2010.04.007.
  12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
  13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215(3):403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
  14. Moe N, Pedersen B, Nordbø SA, Skanke LH, Krokstad S, Smyrmaios A, Døllner H. Respiratory Virus Detection and Clinical Diagnosis in Children Attending Day Care. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159196. doi: 10.1371/journal.pone.0159196.
  15. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivković-Jureković I, Čepin-Bogović J, Gagro A, Vraneš J. Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. *J. Pathog.* 2016;2016:2168780. doi: 10.1155/2016/2168780.
  16. Tapia G, Cinek O, Witsø E, Kulich M, Rasmussen T, Grinde B, Rønningen KS. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J. Med. Virol.* 2008;80(10):1835-1842. doi: 10.1002/jmv.21283.
  17. Zhang DL, Jin Y, Li DD, Cheng WX, Xu ZQ, Yu JM, Jin M, Yang SH, Zhang Q, Cui SX, Liu N, Duan ZJ. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011;17(10):1563-1569. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03390.x.

Поступила: 29.10.2018

Принята к печати: 31.10.2018



Хирургические болезни пищевода и кардии : руководство для врачей / С. А. Алентьев [и др.] ; под ред.: П. Н. Зубарева, С. Я. Ивануца, В. М. Трофимова. – 2-е изд., доп. и испр. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2018. – 303 с. – ISBN 978-5-299-00781-7.

В книге изложены основные сведения по анатомии и патофизиологии пищевода и кардии, освещены вопросы клиники, диагностики, консервативного и оперативного лечения их хирургических заболеваний.

С учетом последних достижений медицинской науки и практики описаны нервно-мышечные заболевания пищевода, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, злокачественные новообразования, травмы, ожоги, болезни оперированного пищевода. Особое внимание уделено хирургической тактике и технике оперативных вмешательств.

Книга представляет интерес не только для молодых начинающих, но и для опытных хирургов.