

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ
П. Л. ШУПИКА

На правах рукопису

СОЛОМКО ЮЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК: 616.988:616.2:616.34]-036.22(477):578.858]-076/.078

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТА МОЛЕКУЛЯРНО-
ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БОКАВІРУСНОЇ
ІНФЕКЦІЇ В УКРАЇНІ**

03.00.06 — вірусологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник

Дзюблик Ірина Володимирівна
доктор медичних наук, професор

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	
БОКАВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ: СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКА, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ТА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	13
1.1. Сучасні уявлення про бокавіруси людини, їх місце в класифікації, загальна характеристика та біологічні властивості	13
1.2. Молекулярно-епідеміологічні та клінічні особливості бокавірусної інфекції	24
1.3. Сучасні методи лабораторної діагностики бокавірусної інфекції людини	28
РОЗДІЛ 2	
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	38
2.1. Матеріали дослідження	38
2.2. Методи дослідження	43
2.3. Характеристика обстеженої групи хворих	48
РОЗДІЛ 3	
РОЛЬ БОКАВІРУСУ ЛЮДИНИ В ЕТІОЛОГІЧНІЙ СТРУКТУРІ ГОСТРИХ РЕСПІРАТОРНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У ДІТЕЙ	50
3.1. Роль бокавірусів людини в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей	51
3.2. Роль бокавірусів людини в етіологічній структурі інфекційного загострення бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у дітей	55
3.3. Епідеміологічні особливості бокавірусної інфекції	61
3.4. Молекулярно-генетичні особливості бокавірусу людини	63

РОЗДІЛ 4

УДОСКОНАЛЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ БОКАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ 71

4.1. Алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей 72

4.2. Науково-методичне обґрунтування вибору тампонів для відбору біологічного матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції 82

РОЗДІЛ 5

КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ВИДІЛЕННЯ БОКАВІРУСУ ЛЮДИНИ В УМОВАХ IN VITRO З НАСТУПНОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЮ ІДЕНТИФІКАЦІЄЮ ЗБУДНИКА 96

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 105

ВИСНОВКИ 115

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 117

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 118

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BPV	- Bovine Parvovirus
CnMV	- Canine Minute Virus
HAdV	- Human Adenovirus
HBoV	- Human Bocavirus
HCoV	- Human Coronavirus
HMpV	- Human Metapneumovirus
HRV	- Human Rinovirus
HRsV	- Human Respiratory virus
HPiV	- Human Parainfluenza virus
HEP-2	- культура аденокарциноми гортані
HeLa	- культура аденокарциноми шийки матки
L ₄₁	- культура моноцитарної лейкемії людини
MDCK	- культура нирки собаки
MERS-HCoV	- Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
NASBA	- Nucleic Acids Sequence Based Amplification
NS	- Nonstructural protein
SARS	- Severe Acute Respiratory Syndrome
VP	- Viral Protein
WRCC	- Walter Reed Canine Cell
БА	- бронхіальна астма
БОС	- бронхообструктивний синдром
ГРВІ	- гострі респіраторні вірусні інфекції
ГРЗ	- гострі респіраторні захворювання
ГКІ	- гострі кишкові інфекції
МФА	- метод флуоресцентних антитіл
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
ПС	- поживні середовища
ПТП	- культура тестикул поросят

СНЕВ	- свиняча нирка ембріональна версенізована
ІХА	- імунохроматографічний аналіз
ІФА	- імуноферментний аналіз
ЦПД	- цитопатична дія

ВСТУП

Гострі респіраторні захворювання (ГРЗ) і в 21 столітті залишаються найпоширенішими інфекційними захворюваннями серед усіх вікових груп населення планети. Щорічно в світі реєструється близько 1 млрд хворих на ГРЗ. Залучення в епідемічний процес такої великої кількості людей, інколи важкі наслідки, значні економічні збитки зумовлюють актуальність респіраторних інфекцій для людства [1].

В Україні на ГРЗ щорічно хворіє 10-14 млн. осіб, що становить 25-30 % від усієї та близько 75-90 % інфекційної захворюваності в країні . Особливо великого значення набувають ГРЗ у дітей, займаючи провідну роль в структурі дитячої захворюваності — до 90 % всієї інфекційної патології [2].

Експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я зазначають, що ця найпоширеніша в людській популяції група захворювань останніми роками постійно зростає [3].

Тільки за останні 15 років прогрес у галузі молекулярно-генетичних технологій призвів до відкриття більше 10 «нових» респіраторних збудників вірусної природи, серед яких велику зацікавленість науковців та практикуючих лікарів викликають: метапневмовірус людини (HMPV), коронавіруси людини (MERS-NCoV і SARS-NCoV) та бокавіруси людини (HBoV) [4–9].

Вперше бокавірус людини був виявлений та ідентифікований в 2005 році у дітей з ГРЗ в Швеції [10].

За період з 2006 по 2010 роки послідовно були відкриті ще три типи бокавірусів людини [11].

Всі чотири бокавіруси людини (HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4) були віднесені до родини *Parvoviridae*, підродина *Parvovirinae*, роду *Bocavirus* [12].

За останні роки HBoV1 був виявлений у 1,5-19,0 % хворих з ГРЗ дітей Німеччини, Італії, Фінляндії, США, Канади та країн Близького Сходу [13-18]. Встановлено, що бокавірусна інфекція зайняла одне з перших місць серед гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) у дитячого населення Європи. [19].

Описані випадки захворювань у дітей з клінічними проявами гострої кишкової інфекції (ГКІ), при цьому, були виявлені НВоV2, НВоV3, НВоV4 [20].

Є окремі повідомлення про виділення та ідентифікацію бокавірусів у хворих на негоспітальну пневмонію, бронхіальну астму (БА) та бронхообструктивний синдром (БОС) [21, 22].

Через те, що бокавіруси людини були ідентифіковані та визнані, як «нові» збудники лише нещодавно епідеміологічні та клінічні прояви захворювань пов'язаних з ними ще не досить вивчені. Необхідно відмітити відсутність будь-яких даних щодо біологічних, молекулярно-генетичних властивостей циркулюючих НВоV в Україні. Не визначені сезонність та вікові особливості бокавірусної інфекції, роль НВоV в етіологічній структурі ГРВІ та інфекційного загострення БА та БОС серед дитячого населення України та можливі наслідки.

Відомо, що клінічні прояви ГРВІ, викликаних різними вірусами є практично однаковими. Крім того, схожі клінічні прояви можуть спостерігатися при захворюваннях, зумовлених бактеріальними збудниками. Відтак, в практиці охорони здоров'я вирішальну роль у підтвердженні клінічного діагнозу відіграє лабораторна діагностика.

Не викликає сумнівів той факт, що тільки своєчасна та ефективна лабораторна діагностика здатна забезпечити правильний вибір тактики лікування і профілактики вірусних інфекцій.

Неефективність традиційних методів лабораторної діагностики, що базуються на виділенні та ідентифікації респіраторних вірусів класичними методами, методами імуноферментного аналізу (ІФА) або методом флуоресціюючих антитіл (МФА), ставлять питання удосконалення етіологічної діагностики ГРВІ, в тому числі бокавірусної інфекції, в ряд найбільш актуальних задач сучасної медицини.

Впровадження молекулярно-генетичних технологій може стати тим перспективним рішенням, що дозволить отримати вичерпну інформацію про етіологію ГРЗ. Молекулярно-генетичні методи, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі та інші методи ампліфікації нуклеїнових кислот, характеризуються високими показниками чутливості та специфічності, дозволяють

використовувати практично будь-який біологічний матеріал для дослідження та отримувати результат за достатньо короткий період часу — 6-10 год.

В умовах інтенсифікації лабораторної діагностики, детекції та ідентифікації «нових» респіраторних вірусів молекулярно-генетичними методами, надзвичайно важливими та своєчасними стають питання розробки алгоритму етіологічної діагностики, оптимізації умов та технології відбору, транспортування та зберігання зразків біологічного матеріалу на преаналітичному етапі досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової ініціативно-пошукової науково-дослідної роботи кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика «Оптимізація стратегій діагностики, профілактики та лікування актуальних вірусних інфекцій на основі клініко-лабораторних та фармакоекономічних досліджень» № держреєстрації 0115U002161.

Мета роботи: дослідити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій у госпіталізованих дітей України та удосконалити лабораторну діагностику бокавірусної інфекції на основі використання сучасних молекулярно-генетичних методів.

Задачі дослідження:

1. Встановити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей.
2. Вивчити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі інфекційного загострення бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у дітей.
3. Дослідити молекулярно-генетичні особливості бокавірусу людини.
4. Удосконалити лабораторну діагностику бокавірусної інфекції.
5. Розробити та науково обґрунтувати алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей на основі застосування сучасних молекулярно-генетичних методів.
6. Розробити метод культивування та виділення бокавірусу людини в перещеплюваних культурах клітин в умовах *in vitro* для поглибленого вивчення біологічних властивостей збудника.

Об'єкт дослідження: бокавірусна інфекція, гострі респіраторні вірусні інфекції, бронхіальна астма і бронхообструктивний синдром, лабораторна діагностика.

Предмет дослідження: діагностичні тести, технології, молекулярно-генетичні методи, бокавіруси людини та інші респіраторні віруси, культури клітин.

Методи дослідження: вірусологічні, експрес-методи, молекулярно-генетичні, статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше в Україні встановлено роль НВоV1 в етіологічній структурі ГРВІ, при інфекційному загостренні БА та БОС у дітей і отримані нові дані щодо молекулярно-генетичних особливостей бокавірусу людини.

Науково обґрунтовано доцільність проведення лабораторної діагностики бокавірусної інфекції з використанням методу ПЛР у моноплексному та мультиплексному форматах.

Вперше розроблено та запропоновано алгоритм етіологічної діагностики, який включав в себе комплекс сучасних молекулярно-генетичних технологій на платформі ПЛР у мультиплексному форматі та експрес-діагностику швидкими ІХА-тестами. Алгоритм дає можливість не тільки підвищити ефективність лабораторної діагностики та ідентифікувати бокавірус людини, але й виявляти одночасно інші респіраторні збудники.

Вперше, на основі скринінгових досліджень перещеплюваних культур клітин в умовах *in vitro* розроблено метод культивування та виділення НВоV1, який дає можливість поглибленого вивчення біологічних властивостей цього вірусу для моніторингу за циркуляцією збудника, вивчення протівірусної дії хіміопрепаратів і дезінфектантів.

Практичне значення одержаних результатів. Удосконалено лабораторну діагностику бокавірусної інфекції у дітей, оптимізовано преаналітичний етап дослідження на бокавіруси та інші респіраторні віруси, надані рекомендації та запропоновано метод ПЛР у мультиплетному форматі на виявлення 12-16 респіраторних вірусів.

Розроблено алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції, що дає можливість встановити причину захворювання в 90,3 % випадків, а також зробити оптимальний вибір молекулярно-генетичних методів і швидких ІХА-тестів та їх комбінації для виявлення мікст-інфекції респіраторних вірусів і бактеріальних збудників з отриманням результату в термін від 15 хвилин до 12 годин.

Результати дослідження впроваджено в практику вірусологічних лабораторій ДУ «Київський міський лабораторний центр МОЗ України» і Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ», клініко-діагностичну лабораторію «Київського міського центру профілактики та боротьби зі СНІДом».

По матеріалам дисертації підготовано та впроваджено інформаційні листи про нововведення в систему охорони здоров'я: № 72-2016 «Алгоритм лабораторної діагностики вірусних і бактеріальних інфекцій у дітей з бронхообструктивним синдромом» і № 73-2016 «Детекція та ідентифікація вірусу грипу та інших респіраторних збудників методом полімеразної ланцюгової реакції в мультиплексному форматі у реальному часі».

Розроблені та впроваджені в практику охорони здоров'я методичні рекомендації «Фармакоекономічні підходи до раціонального використання засобів лабораторної діагностики респіраторних вірусних інфекцій» (Київ 2016).

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі кафедр вірусології та педіатрії № 1 НМАПО імені П. Л. Шупика. Крім цього, матеріали дослідження увійшли до навчально-методичного посібника для лікарів, лікарів-інтернів і лікарів-слухачів закладів (факультетів післядипломної освіти) «Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб» (Київ 2012) та у «Збірних тестових завдань з вірусології» (Київ 2015).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою працею автора. Дисертантом самостійно здійснено патентно-інформаційний пошук, опрацьовані дані літератури за темою дисертаційної роботи, обрано та обґрунтовано етапи та методи дослідження, їх виконання та аналіз отриманих результатів.

Здобувачем самостійно проведено дослідження біологічного матеріалу, розроблено алгоритм лабораторної діагностики, проведені експериментальні

дослідження щодо оптимізації преаналітичного та аналітичного етапів.

Автор висловлює щирю подяку науковому керівнику д.мед.н професору Дзюблик І. В. за сприяння та допомогу у виконанні дисертаційної роботи.

Провідному науковому співробітнику ЦНДЛ НМАПО імені П. Л Шупика к.б.н. Трохименко О. П. за проведення експериментальних досліджень у культурах клітин.

Старшому науковому співробітнику ЦНДЛ НМАПО імені П. Л Шупика к.б.н. Соловйову С. О. за допомогу консультативного характеру при роботі над методичними рекомендаціями.

Співробітниками кафедри педіатрії № 1 НМАПО імені П. Л. Шупика, завідувачу кафедри, д.мед.н професору Охотніковій О. М., асистенту, к.мед.н. Руденку С. М. і співробітникам кафедри дитячих інфекційних хвороб Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, завідувачу кафедри, д.мед.н. професору Надразі О. Б., клінічному ординатору Гладченко О. І. за здійснення клінічних обстежень дітей.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи були представлені доповідями на науково-практичних конференціях: «Актуальні інфекційні захворювання: клініка, діагностика, лікування та профілактика» (22–23 листопада 2012р., м. Київ); 7-й міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (10–13 вересня 2013 р., м. Київ); науково-практичній конференції молодих вчених з міжнародною участю «Наукова та інноваційна діяльність молодих вчених: сьогодення та перспективи» (25 квітня 2013р., м. Київ); Scientific and Practical Conference «Respirology» (2014р., Stockholm); науково-практичній конференції молодих вчених з міжнародною участю «Сьогодення і майбутнє науки в практичній медицині» (22 травня 2014р., м. Київ); 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Лабораторная диагностика 2014» (28–29 марта 2014р., г. Москва); науково-практичній конференції молодих вчених з міжнародною участю «ХИСТ» (26–27 лютого 2015р., м. Чернівці); науково-практичній конференції молодих вчених з міжнародною участю «Сучасна медицина: актуальні питання» (17–18

листопада 2015р., м. Одеса); науково-практичній конференції молодих вчених НМАПО імені П.Л. Шупика, «Науково-практична діяльність молодих вчених медиків: досягнення і перспективи розвитку» (20 травня 2016р., м. Київ).

Публікації. Матеріали дисертації були висвітлені у 20 наукових працях, з них 11 статей у фахових журналах і збірниках наукових праць (1 – одноосібна, 10 – у співавторстві), 4 тез у збірниках матеріалів наукових конференцій та з'їздів, 2 навчально-методичних посібника, 1 методичні рекомендації та 2 інформаційні листи.

Структура і обсяг роботи. Робота викладена на 140 сторінках друкованого комп'ютерного тексту, складалася зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів, трьох розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій. Список літератури налічує 210 джерел, з них 177 опубліковані латиницею. Робота ілюстрована 37 малюнками, містить 12 таблиць.

РОЗДІЛ 1

БОКАВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ: СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКА, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТА КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ІНФЕКЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Сучасні уявлення про бокавіруси людини, їх місце в класифікації, загальна характеристика та біологічні властивості

Восени 2005 року шведською дослідницькою групою на чолі з Тобіасом Алландером було виявлено «новий» вірус у дітей хворих на ГРЗ невизначеної етіології, який отримав назву «Бокавірус людини» (Human Bocavirus, HBoV).

У своїх дослідженнях вчені застосовували метод молекулярно-вірусного скринінгу. За допомогою якого провели обробку зразків біологічного матеріалу розчином ДНК-зи з подальшою ампліфікацією методом ПЛР, клонуванням отриманих випадкових нуклеотидних послідовностей, їх секвенуванням і біоінформативним аналізом отриманих продуктів. У результаті біоінформативного аналізу за допомогою програми BLAST і бази даних (GenBank), яка містила усі відомі нуклеотидні послідовності ДНК/РНК, а також нуклеотидні послідовності закодованих в них білків. Співпадіння з послідовностями геному парвовірусів великої рогатої худоби (Bovine Parvovirus, BPV) і парвовіруси собак (Canine Minute Virus, CnMV). У результаті, «новий» вірусний збудник отримав назву- Human Bocavirus (бокавірусу людини) шляхом комбінації перших двох літер «Bo» із слова «Bovine» і «Ca» із слова «Canine» [23].

Оскільки, HBoV людини виявлено в біологічних матеріалах дихальних шляхів, дослідники висунули гіпотезу, що він викликає лише респіраторні

захворювання, а у 2007 році його було переіменовано у НВoV1 [24].

У грудні 2007 року іспанськими дослідниками під керівництвом Дієго Віценте виявлено НВoV людини в 58 % випадків у зразках випорожнень хворих на гострий гастроентерит дітей [25].

У 2009 році опубліковано працю американських дослідників на чолі з Амітом Капуром, в якій йшлося про виявлення НВoV нового типу в зразках випорожнень від дітей хворих на ГКІ невизначеної етіології. Проведений метагеномний аналіз нового збудника показав, що він має подібний геном з НВoV. Подібність визначалася для структурних білків (VP1 і VP2) у 80 % випадків відповідно і для неструктурних білків (NS1, NP1) у 78 % і 67 % відповідно [26].

Дещо згодом у зв'язку з виділенням високої генетичної дивергенції тип НВoV2 розділили на три субтипи: НВoV2А, НВoV2В, НВoV2С [27].

У квітні 2009 року в австралійському медичному університеті, Джейн Артур і колеги дослідили 183 зразка випорожнень від дітей хворих на гастроентерит методом ПЛР. Результат дослідження показав наявність у 17 % випадків нового збудника НВoV. Для визначення типу НВoV, який спричинив захворювання на гострий вірусний гастроентерит, збудник клонували та секвенували. За результатами дослідження виявлений тип бокавірусу людини отримав назву - НВoV3 [28].

Удослідженні Аміта Капура і співавторів, яке було опубліковано в 2010 році йшлося про ідентифікації нового бокавірусу людини у зразках випорожнень, які відбирали в рамках реалізації проекту ВООЗ «Ліквідація поліомієліту». Матеріал відбирали у дітей віком від 4 місяців до 15 років, які мали контакт з хворими на поліомієліт в Нігерії та Тунісі. Фекалії досліджували згідно стандартного протоколу, на наявність вірусів: поліомієліт, рота-, адено-, астро- та норовіруси. Негативні результати діагностики підштовхнули вчених дослідити зразки випорожнень на відомі типи бокавірусів людини. В результаті молекулярно-генетичного скринінгу, клонування та секвенування було відкрито НВoV4. Новий тип бокавірусу людини був подібен до інших типів за організацією геному [29].

1.1.1. Таксономія родини Parvoviridae

Родина *Parvoviridae* до складу якої у 2007 році були введені бокавіруси людини. До складу родини увійшли 56 вірусних збудника, які розподілено між двома підродинами: *Densovirinae* та *Parvovirinae*.

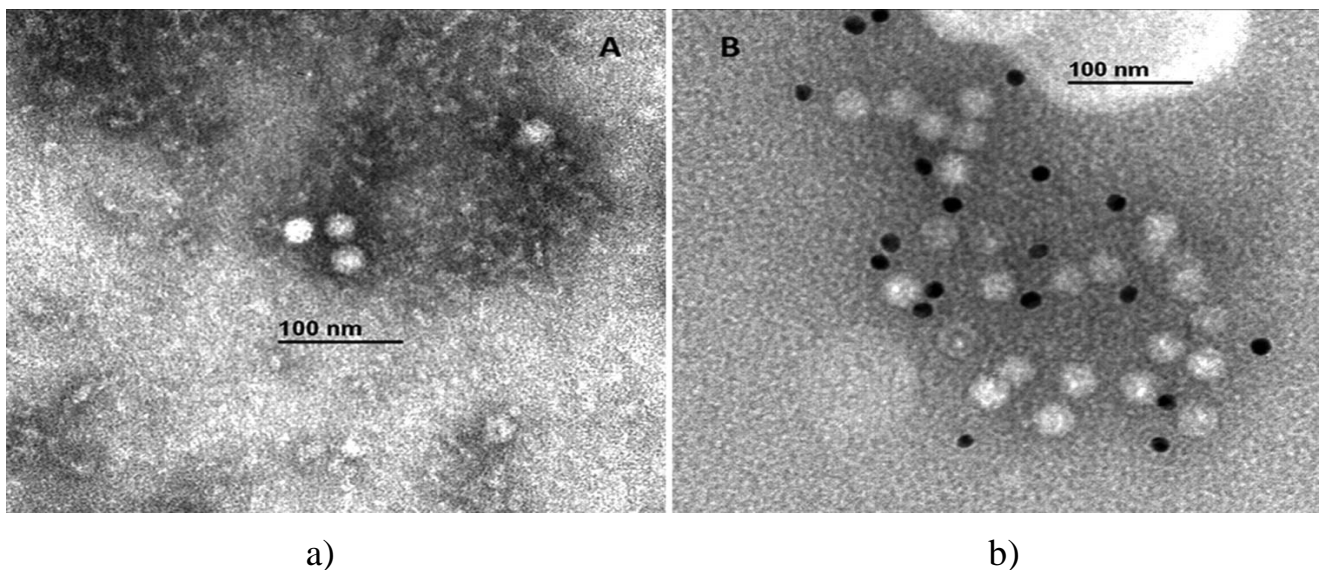
Підродина *Densovirinae* нараховує 5 родів: *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus* та *Iteradensovirus* (уражають комах), а *He pandensovirus* і *Penstyl densovirus* (уражають креветок) [30].

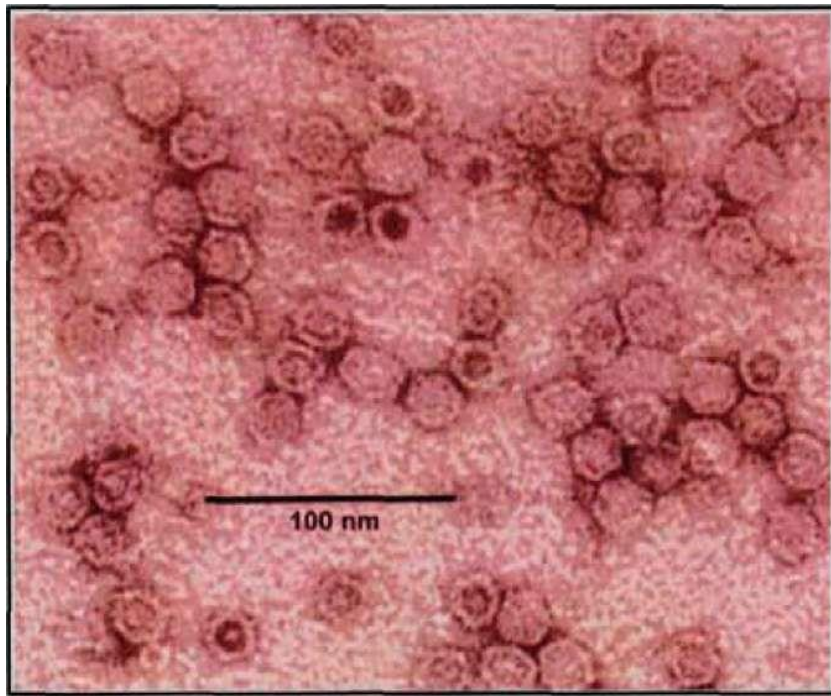
До підродина *Parvovirinae* увійшли 8 родів: *Amdoparvovirus* (інфікують норок і лисиць), *Averparvovirus* (інфікують індичок і курчат), *Soriparvovirus* (інфікують корів і свиней), *Protoparvovirus* (викликає гастроентерит у цуценят), *Tetraparvovirus* (інфікують летючих мишей, овець, свиней, корів і приматів), а *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus* і *Vocavirus* (інфікують велику рогату худобу, собак, норок, приматів і людину) [31].

1.1.2. Структура бокавірусів людини

Бокавіруси людини мають такі ж особливості будови, що і всі інші представники родини *Parvoviridae*.

Віріони парвовірусів являють собою прості безоболонкові ізометричні частинки розміром 18-26 нм (рис. 1.1 (а), (b) та (с)).





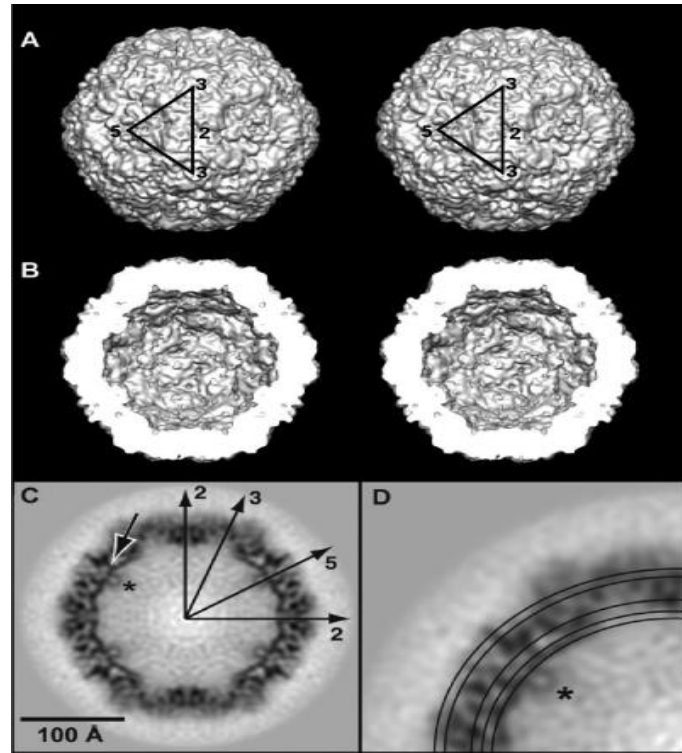
с)

Рис. 1.1. Електронна мікрофотографія частинок НВоV людини (а), (b) та (с)
 а) – препарат приготовано зі суспензії зразка (змиву з носоглотки хворого),
 б) – препарат приготовано зі суспензії плазми і змиву від хворого на ГРВІ.
 Обидва препарати негативно пофарбовано розчином 2 % фосфоровольфрамової
 кислоти (РТА; рН 4,5) та проаналізовано за допомоги електронного мікроскопу
 (JEM 1200 EX II, Jeol, Japan) при збільшенні в $\times 200,000$ [32]
 с) - електронна мікрофотографія часточок НВоV негативно пофарбованих
 ацетатом уранілу [33]

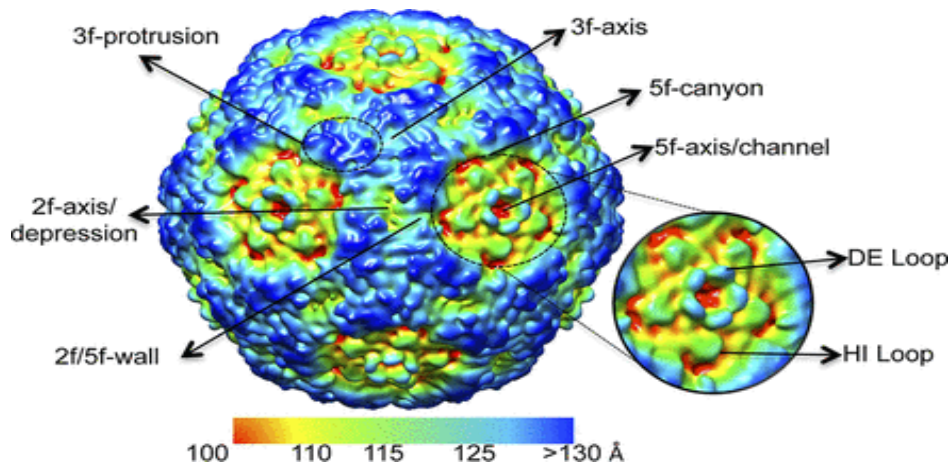
Білкова оболонка (капсид) кубічного типу симетрії, надає віріону сферичної форми. Капсид НВоV людини складається з 60 симетрично розташованих капсомерів. Кожен капсомер побудований із 2-х капсидних білків, які позначаються, як Viral Protein 1 (VP1) і Viral Protein 2 (VP2).

Білки капсиду складають 60-80 % всієї маси віріону. Молекулярна маса VP1 (найбільшого капсидного білка) коливається в межах 83-96 кДа, для VP2 вона становить 58-85 кДа. Капсидні білки VP1 і VP2 є структурними білками. Вони розміщені на 3'-кінці геному і мають спільний С-кінець, проте, білок VP1 довший за VP2 на 129 нуклеотидів.

Стосовно структурного білка бокавірусу людини VP2 необхідно відмітити, що він багатofункціональний і здатен формувати у цитоплазмі клітини-господаря вірус-подібні часточки [34] (рис. 1.2 (a) та (b)).



a)



b)

Рис. 1.2. Структура бокавірусу людини (a) та (b)

a) – поверхня капсиду – крио-реконструкція (зріз) [34]

b) – зображення капсиду НВoV із застосуванням криоелектронної мікроскопії та три-мірної реконструкції зображення з розширенням 7,9Å (банк даних електронної мікроскопії [EMDB] ID 1739) [35]

По своїй будові генوم НВоV представлено лінійною нефрагментованою молекулою ДНК. На обох кінцях ДНК є інвертовані послідовності, які містять сайти прикріплення неструктурного білка NS1 [36].

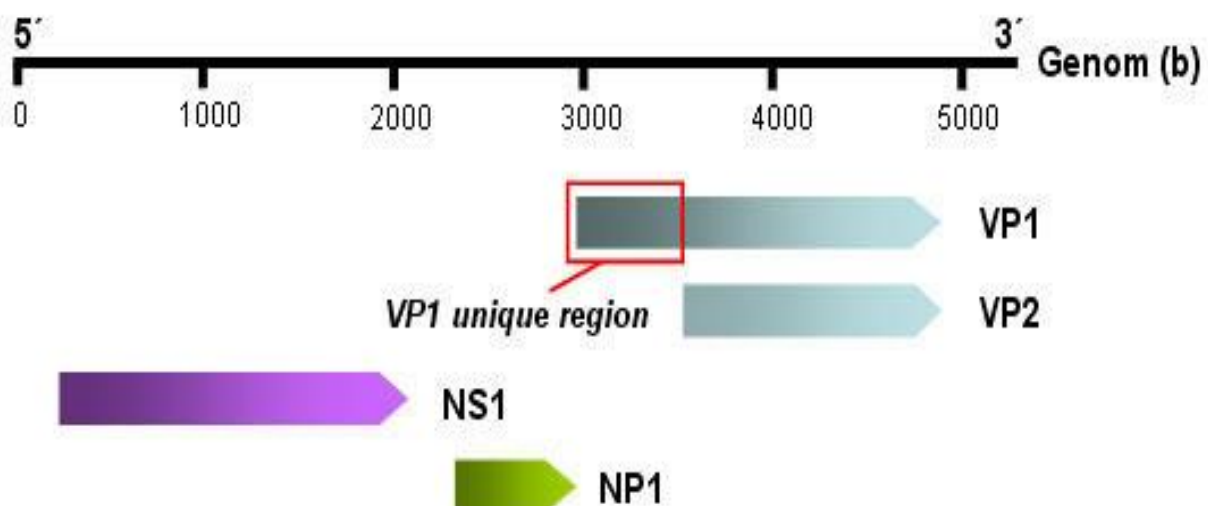
Геном має 5217 нуклеотидів і три відкриті рамки трансляції. Перша відкрита рамка трансляції на 5'-кінці кодує неструктурний білок NS1 масою 70-80 кДа, який під час циклу реплікації парвовірусів діє як багатофункціональний білок. До основної його функції можна віднести зупинку клітинного циклу. Білок інтерферує з реплікацією клітини ДНК [37, 38].

Друга відкрита рамка кодує другий неструктурний білок NP1 (маса 26 кДа). Її особливість полягає в тому, що вона є унікальною для представників роду *Bocavirus*. Відомо, що цей білок відіграє важливу роль в зупинці клітинного циклу [39].

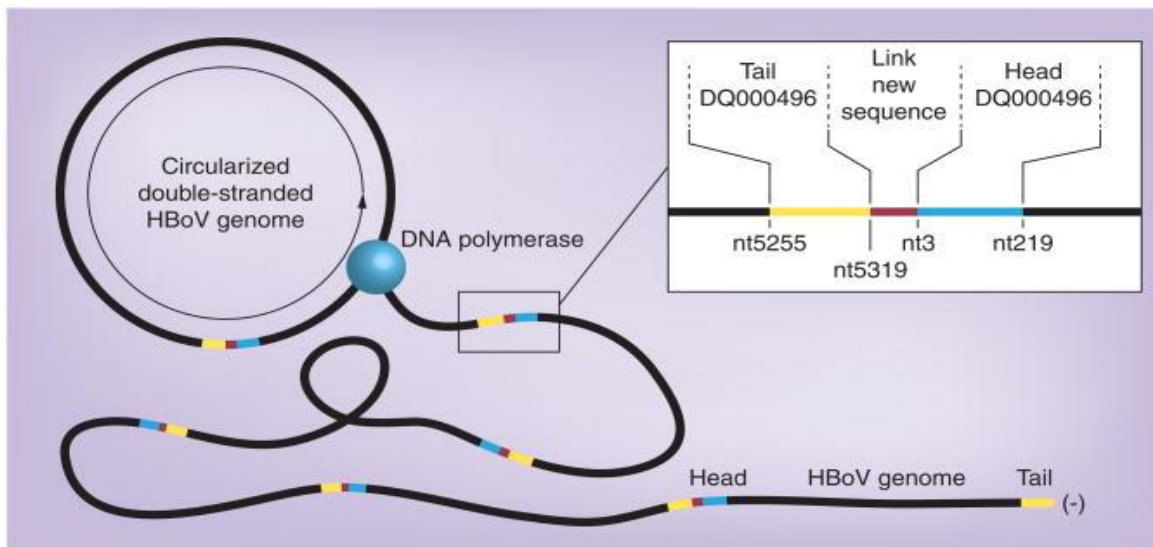
Третя відкрита рамка в 3'-кінці кодує два структурні білки VP1 (84 кДа) VP1 і VP2 (65 кДа) [40].

Роль неструктурних білків і досі залишається предметом вивчення. Встановлено, що генوم НВоV не кодує полімерази, а від так, його реплікація залежить виключно від ДНК-полімерази клітини-господаря [41].

Схема геному бокавірусу представлена на рис. 1.3. (а) та (б)).



a)



b)

Рис. 1.3. Схема геному бокавірусів людини (а) та (б)

- a) - умовне зображення геному НВoV з урахуванням положення і довжини трьох відкритих рамок трансляції вірусних білків показані стрілками [43]
- b) - модель геному бокавірусу на прикладі шпильки, яка в русі замінює нуклеотидну послідовність матричної шпильки шляхом комплементарності утворюючи дві форми «фліп» і «флоп», які постійно міняються [42]

1.1.3. Репродукція бокавірусів

Усі парвовіруси тропні до епітеліальних клітин, які швидко діляться та знаходяться в фазі синтезу ДНК, коли в клітині активна ДНК-полімераза, яка виконує реплікативну функцію.

Цикл репродукції бокавірусів людини подібний до життєвого циклу інших парвовірусів. Механізм проникнення вірусу відбувається за рецепторним ендоцитозом. Роздягання вірусу відбувається в ядрі. Структурні білки та їх фрагменти ініціюють експресію вірусних генів [44, 45].

Для реплікації бокавіруси людини використовують ДНК-синтезуючий апарат клітини-господаря. Всі парвовіруси мають унікальний геном, представлений одностатковою лінійною нефрагментованою молекулою ДНК, на обох кінцях якої наявні інвертовані послідовності.

У багатьох представників родини парвовірусів геномна ДНК має негативну

полярність і позначається, як ДНК-мінус, а в інших - позитивну полярність (ДНК-плюс). Позитивна та негативна нитки ДНК у парвовірусів комплементарні одна одній і в умовах *in vitro* можуть утворювати повнорозмірну двониткову ДНК [46].

Репродукція НВoV людини, як і у всіх членів родини Parvoviridae відбувається в чутливій клітині та включає в себе наступні етапи:

- взаємодію вірусу з рецепторами клітини-господаря, шляхом прикріплення рецептору вірусу до чутливого рецептору клітини-господаря;

- проникнення вірусу до чутливої клітини за механізмом рецепторного ендоцитозу. З цитоплазматичної мембрани за допомогою комплексу мікротрубочок віріон транспортується до ядра клітини-господаря. Далі, відбувається інтеграція вірусу в ядро клітини;

- «роздягання» у ядрі клітини, перетворення однострочної молекули ДНК у двониткову під дією ДНК-полімерази клітини-господаря та власних білків;

- транскрипція неструктурних білків NS1 і NP1 та ініціація циклів реплікації однострочної молекули ДНК;

- транскрипція структурних білків VP1 і VP2 під контролем неструктурних білків;

- збирання вірусних часток під контролем NS1 в ядрі клітини-господаря, міграція зрілих вірусних часток у цитоплазму та вихід в міжклітинний простір в результаті лізису інфікованої клітини [47] див. рис. 1.4.

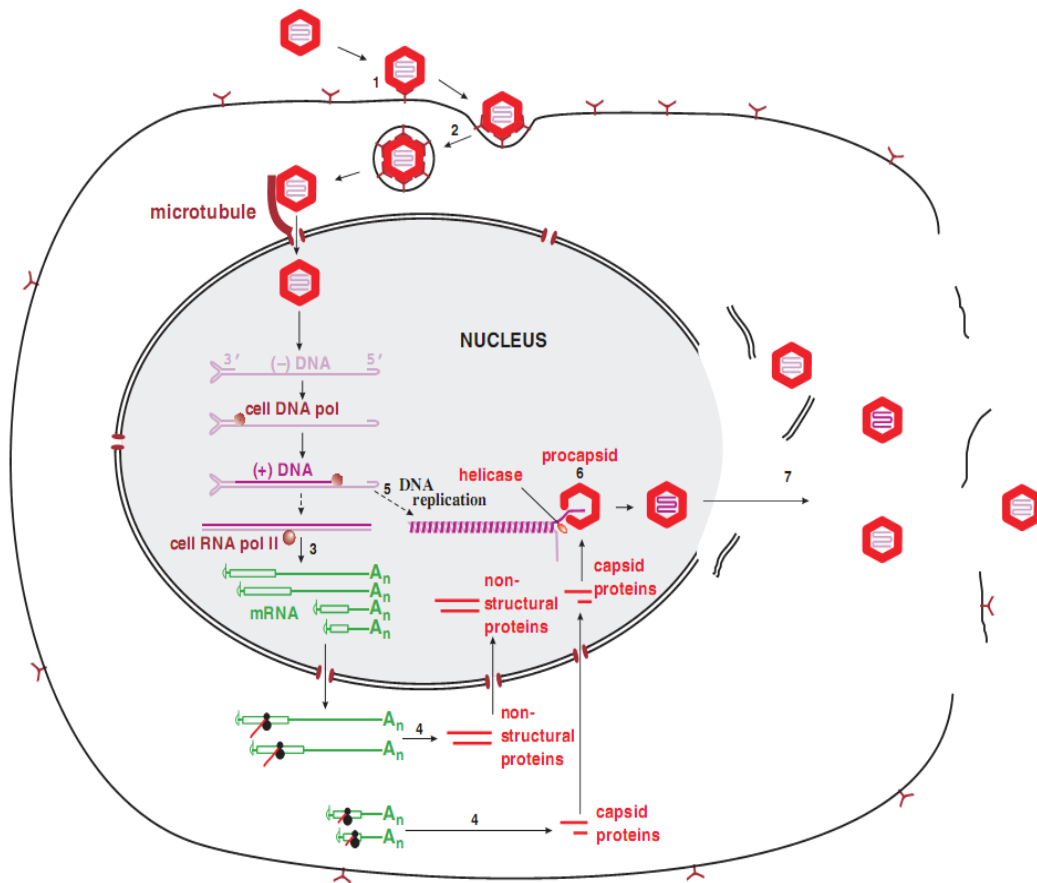


Рис. 1.4. Схематичне зображення життєвого циклу та основні етапи репродукції бокавірусу людини [48]

Взаємодія вірусу з рецепторами клітини

2. Проникнення вірусу в клітину

3. Транскрипція

4. Трансляція

5. Реплікація геномної ДНК

6. Збирання

7. Вихід вірусу з клітини

1.1.4. Біологічні властивості бокавірусів людини

Проста будова бокавірусів людини забезпечила їм надзвичайно високу стійкість у навколишньому середовищі та до дії різних фізико-хімічних чинників.

Поза межами організму людини, в навколишньому середовищі НВoV здатні тривало, протягом багатьох місяців, зберігати свою інфекційну активність. Віруси стійкі до прогрівання при температурі 56°С впродовж години, до перебування у кислому середовищі (рН 3,0) впродовж 30 хвилин, до дії формаліну у концентрації 0,1 %, органічних розчинників (хлороформу, спиртів, жовчі, трипсину) і впливу фізичних методів інактивації [49].

Майже миттєво бокавіруси людини руйнуються при кип'ятінні, чутливі до обмеженої кількості дезінфікуючих засобів (гіпохлорид, глутаральдегід, формальдегід, β-пропіон-лактон та деяких інших). У 0,5 % розчині формаліну НВoV людини гинуть впродовж 24 годин [50, 51].

До тепер, виявити бокавіруси людини можна було лише за допомоги методу ПЛР, однак, на сьогодні описано декілька спроб культивувати вірус в епітеліальних клітинах дихальних шляхів. Були спроби культивувати бокавіруси людини, в яких вчені досягли як невдачі, так і успіху.

Перший досвід вивчення біологічних властивостей парвовірусів було розпочато у 2010 році. Група вчених під керівництвом Ані Чен виділяли парвовірус собак (CnMV) у культурі клітин WRCC (Walter Reed Canine Cell). Через 18 годин під електронним мікроскопом дослідники спостерігали цитопатичну дію (ЦПД), яка формувалось за механізмом апоптозу. Окрім апоптозу, вчені спостерігали прогресуючу затримку клітинного циклу у фазах G2 / M в інфікованій CnMV культурі клітин WRCC. В результаті дослідження встановлено, що рівень клітинної смерті тісно корелював із рівнем реплікації вірусу [52-54].

Групою дослідників з Нідерландів під керівництвом Роналда Дайкмана проведено експеримент із культивування НВoV1 в модифікованій культурі клітин людського епітелію дихальних шляхів. Реплікацію вірусу в культурі клітин контролювали під електронним мікроскопом, а наявність НВoV1 в аліквотах відібраних під час експерименту - методом ПЛР. Вчені прийшли до висновку, що використання запропонованої ними культури клітин, може виявитися корисним в подальшому для вивчення патогенезу бокавірусної інфекції [55-57].

У 2015 році Шен Вейран і колеги досліджували акцепторні і донорські сайти сплайсингу, а саме, A1' та D1', в області кодування неструктурного білка (NS1) мРНК попередника HBoV1. В результаті експерименту було підтверджено, що два нові сайти сплайсингу генерують транскрипти мРНК, а нові NS-білки (NS2, NS3 і NS4) призводять до експресії після трансфекції інфекційної парвовірусної плазмиди HBoV1 в культурі клітин HEK 293 (ембріональна нирка людини) [58].

В роботі Бін Сан і колег «The nonstructural protein NP1 of Human Bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells» показано, що неструктурний білок HBoV1 людини NP1 призводить до апоптозу клітин культури HeLa [59].

Вдала спроба виділення бокавірусу в чутливій культурі клітин належала Джеймсу Дайкману і колегам у 2009 році, вони досліджували біологічні властивості бокавірусів людини. У дослідженні використовували культуру епітеліальних клітин бронхіального дерева людини для культивування HBoV1. В результаті проведеного дослідження вчені зареєстрували та описали характер ЦПД вірусу через 4 дні після інокуляції клітин зразками назофарингеальних аспіратів хворих, які за даними ПЛР містили бокавірус. При цьому спостерігалось два типи ЦПД – виражена округло клітинна дегенерація та формуванні синцитіїв. Здатність HBoV1 розмножуватись в бронхіальних епітеліальних клітинах людини контролювалась за допомогою реакції гемадсорбції та методом імунофлюоресценції [60].

Філогенетичний аналіз вивчених штамів бокавірусів людини 1-4 типів показав рівномірне виявлення різних типів при різних патологіях, так бокавірус 1 типу виявляли при захворюваннях респіраторного тракту без кишкової патології, а типи 2-4 при гострих гастроентеритах. Більш детальний аналіз геномів HBoV1, HBoV2 і HBoV4 показав, що HBoV3 походить від HBoV1 і HBoV4. Філогенетичне дерево побудовано шляхом поєднання сусідніх максимальних сумарних відступів між нуклеотидними послідовностями бокавірусів людини. Найменування послідовностей наведених на рис. 1.5. є кодами доступу в Genbank, за ними позначені штами видів HBoV [61]. Дерево побудовано методом максимального співпадіння з використанням моделі заміни GTR + G [62].

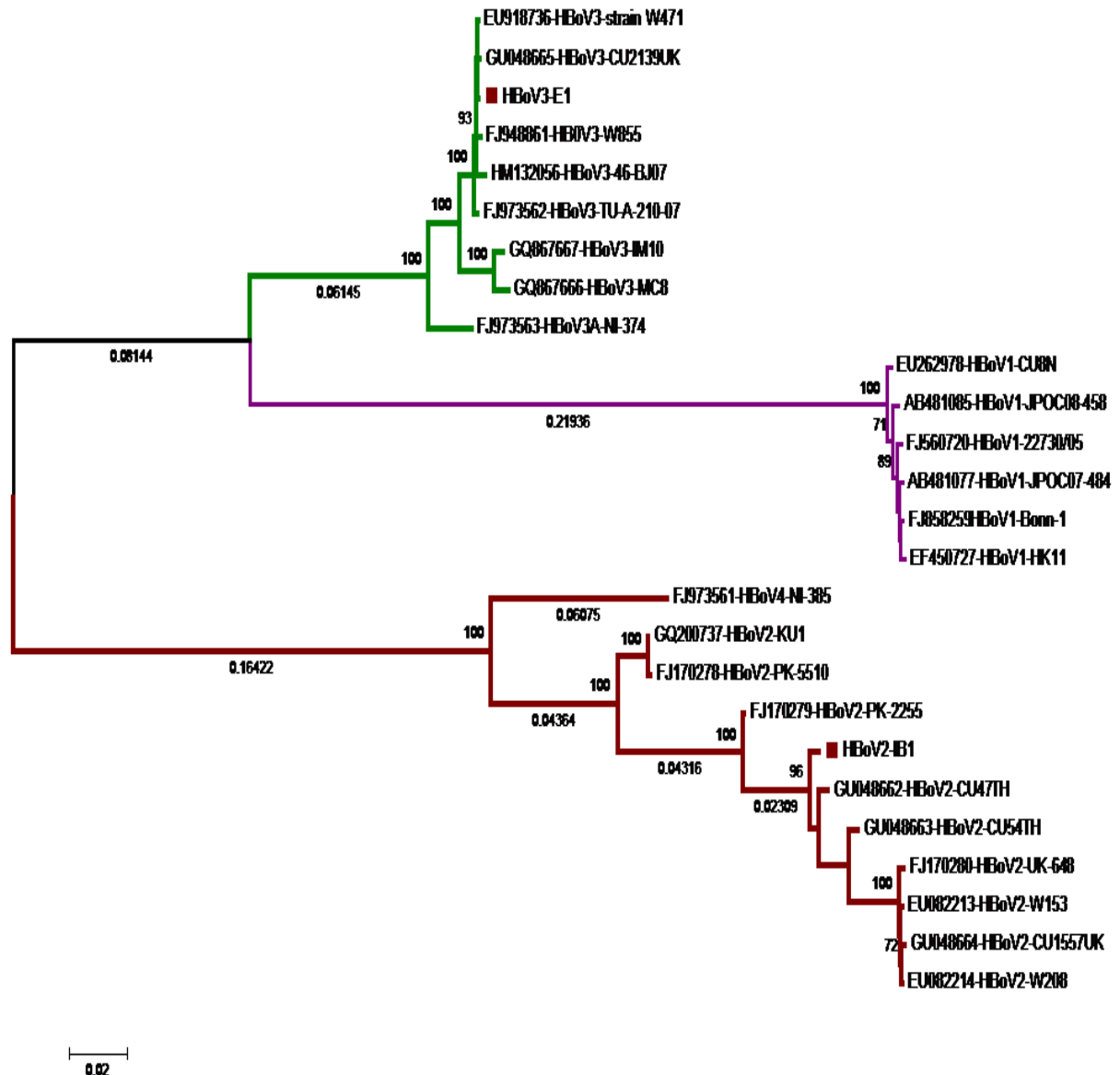


Рис. 1.5. Філогенетичне дерево бокавірусів людини [61]

1.2. Молекулярно-епідеміологічні, клінічні особливості НBoV та підходи до лікування бокавірусної інфекції

Характеризуючи молекулярно-епідеміологічні особливості бокавірусної інфекції людини, важливо підкреслити, що на сьогодні у світі циркулюють чотири типи бокавірусів людини: НBoV1, НBoV2, НBoV3, НBoV4 [63].

В Європі у дітей хворих на ГРВІ виявляли НВоV1 у 2,8-44,0 % випадків [64-72].

В Північній Америці у хворих з ГРВІ виявляли НВоV1 в 43,0 % дітей та у 13,8 % дорослих [73-77]. У Канаді в 2007 році у дітей віком до одного року з проявами ГРВІ присутність НВоV1 була доведена тільки у 5,1 % випадків [78-85].

Встановлена циркуляція НВоV1 серед дитячого та дорослого населення Австралії, ДНК НВоV1 людини виявлено в 52,1 % дітей та у 44,3 % дорослих, хворих на ГРВІ [86-89]. Перші повідомлення про захворювання верхніх дихальних шляхів у дітей африканських країн стали надходити з 2006 року [90-95].

У 2007 році надійшло перше повідомлення про виявлення НВоV1 у дорослого та дитячого населення в країнах Близького Сходу [96-103].

Вченими з Південної Кореї було проведено дослідження по виявленню НВоV1 у 5,6 % хворих на ГРВІ дітей віком до 5 років [104].

Ендо Рі та колеги у своїй роботі «Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture of Japan» досліджували матеріал, відібраний у хворих із захворюваннями нижніх дихальних шляхів, на наявність НВоV1 методом ПЛР із застосуванням специфічних праймерів. За результатами дослідження бокавірус людини було виявлено в 78,1 % випадків [105].

Встановлено, що в 2013–2014 роках НВоV-інфекція зайняла одне з перших місць серед ГРВІ у дитячого населення Європи. Так, у Німеччині ГРВІ, що викликані НВоV1 посіли друге місце після респіраторно-синцитіальної інфекції (РС-інфекції), в Італії – третє місце, поступаючись лише РС-вірусній та риновірусній інфекціям, у Голандії – четверте місце [106-108].

В публікаціях найближчих сусідів, які межують з територією України, описано виявлення НВоV1 людини у дітей хворих на ГРВІ [108-116]. Серед дітей, віком від одного місяця життя до 15 років госпіталізованих в стаціонари міста Москви, НВоV1-інфекція була виявлена у 14,0 % із них як моноінфекція, та в 10,1 % – як мікст-інфекція з іншими респіраторними вірусами. Часто бокавірусну інфекцію було діагностовано та лабораторно підтверджено у дітей при менінготрахеїтах, а також, при бронхіті та негоспітальній пневмонії [117, 118].

В країнах Південної Америки, Північної Африки та Австралії у хворих дітей з клінічними проявами ГКІ виявляли НВов2 [119-123].

Для країн Південно-Східної Азії характерна циркуляція НВов3. Збудник виявляли приблизно у 1 % випадків хворих дітей на гострий гастрит невизначеної етіології [124, 125].

У статті автора Маноло Альбукерке з Бразилії НВов4 виявляли у хворих на гострі респіраторні інфекції дітей у 0,4 % випадків [126].

Ряд авторів у своїх дослідженнях відмічали випадки вірусно-вірусної мікст-інфекції, так НВов1 виявлено з риновірусами та з аденовірусами. Дослідження у хворих з ускладненим перебігом ГРЗ покладено наявність у 25 % випадків бокавірусної інфекції у вигляді мікст-інфекції з двома та більше збудниками, а у одного хворого – мікст-інфекцію НВов1 зі шістьма патогенами бактеріально та вірусної природи [127-131].

Уцілому, діапазон мікст-інфекцій НВов з іншими респіраторними збудниками вірусної і бактеріальної природи коливається в досить широких межах, що і на сьогодні не знаходить чіткого науково обґрунтованого пояснення [132].

Характеризуючи епідеміологічні особливості НВов1-інфекції, більшість дослідників відмічають сезонний підйом захворюваності, принаймні у Північній півкулі. Це взимку, частіше з грудня по березень місяць [133-135].

Проте, Маноло Гарсія [136] та Норі Каплан [137] відмічають підйом захворюваності в осінні місяці року та вказують на реєстрацію випадків зумовлених НВов1 у літні місяці року.

Механізми і шляхи передачі НВов1 остаточно не визначені. Є припущення, що основним механізмом передачі збудника інфекції є повітряно-крапельний, а в якості резервного – може виступати фекально-оральний механізм [138-146].

Більшість пацієнтів з підтвердженою НВов1-інфекцією, що приймали участь у дослідженнях мали наступні клінічні симптоми: кашель (78,9 %), гарячку (67,1 %) і нежить (66,2 %). Фарингіт і висипання зустрічалися рідко – в 11-13 % випадків. Крім того, пацієнти часто, скаржилися на біль у вухах. Підвищення температури тіла спостерігали в межах від 37,5 до 40,2° С, ринорея могла тривати від 2 до 23 діб

[147].

Важливо підкреслити, що не описано жодного смертельного випадку, пов'язаного з НВоV1 [148].

В багатьох дослідженнях показано, що у майже 25 % пацієнтів, які мали НВоV1-інфекцію верхніх та нижніх дихальних шляхів, реєструвалися симптоми ураження шлунково-кишкового тракту - це діарея (14 %), зневоднення, нудота, блювання (23,9 %) та інші прояви. Також потрібно зазначити, що кількість НВоV1, що виявляється у зразках випорожнень у хворих була значно меншою, порівняно зі зразками відібраними з дихальних шляхів у пацієнтів [149].

В публікаціях авторів відмічалось, що НВоV1 людини виявляли у дітей госпіталізованих з діагнозами: ГРВІ, бронхіоліт, загострення бронхіальної астми, ринофарингіт, ларинготрахеїт, гострий бронхіт [150-152].

Утруднене дихання було помічене у більш ніж 50 % дітей, у яких НВоV1 визнаний в якості єдиного збудника захворювання. Встановлена етіологічна роль НВоV1 у розвитку негоспітальної пневмонії [153].

Бокавірусну інфекцію було виявлено у пацієнтів з імунodefіцитом при респіраторних і шлунково-кишкових захворюваннях, у пацієнтів після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, у дітей з гострим лімфобластним лейкозом, у дорослих осіб з ВІЛ-інфекцією [154-156].

Можна зазначити також, що на часі, ще не встановлено тривалість інкубаційного періоду при респіраторній бокавірусній інфекції. Наявність в респіраторному тракті малих концентрацій НВоV та виявлення вірусу у пацієнтів при повторній госпіталізації з інтервалом в 1-6 місяців можуть свідчити про можливість формування хронічної форми інфекції [157-160].

Проте, подібність клінічних проявів, які спричинюються різними респіраторними вірусами та відсутність патогномонічних симптомів при більшості з них не дозволяє поставити діагноз без лабораторних досліджень.

Нажаль сьогодні ще не розроблено підходи до лікування бокавірусної інфекції. Проте, симптоматичне лікування можна призначати при важкому перебігу хвороби.

1.3. Сучасні методи лабораторної діагностики бокавірусів людини

Сьогодні не викликає сумніву той факт, що рання етіологічна діагностика гострих респіраторних інфекцій необхідна для проведення раціональної етіотропної терапії, прогнозування важкості захворювання та профілактики внутрішньо-лікарняних інфекцій.

До недавнього часу вважалося, що методи лабораторної діагностики гострих респіраторних вірусних інфекцій людини включають в себе: виділення та ідентифікацію збудника в живих системах, виявлення та визначення наростання титрів противірусних антитіл в сироватці крові, детекцію антигенів респіраторних вірусів в зразках біологічного матеріалу та мікроскопічні дослідження. Безумовно, що «золотим» стандартом лабораторної діагностики ГРВІ вважається класичний метод виділення збудника на курячих ембріонах та у культурі клітин, з наступною ідентифікацією типоспецифічними сироватками реакціями: нейтралізації, зв'язування комплементу та гальмування гемаглютинації [161, 162].

На часі, прогрес у галузі лабораторної діагностики широко застосовуються молекулярно-генетичні методи, специфічність яких заснована на унікальності нуклеотидних послідовностей вірусних геномів. Завдяки впровадженню методу ПЛР в лабораторну практику було відкрито багато «нових» респіраторних вірусів, у тому числі і бокавірусів людини. Дослідники вибирали метод завдяки його превалюючим характеристикам: специфічності, чутливості, швидкості у виконанні (6-8 годин), виявленню збудників, які не культивуються в умовах *in vitro* або *in vivo*.

Принцип методу ПЛР розроблений Кері Муллісом у 1983 році. Простота виконання, надзвичайно високі показники чутливості та специфічності принесли автору та його методу величезну популярність у 21 столітті, завдяки чому ПЛР зайняла особливе місце в лабораторній діагностиці найбільш актуальних вірусних і бактеріальних інфекцій. За короткий термін часу ПЛР, як метод почали застосовувати у всьому світі. Згодом, метод вийшов за межі лабораторій, наукових установ і перетворився на «діагностичний інструмент третього тисячоліття» [163, 164].

В основу методу ПЛР покладено багатоступеневий процес реплікації ДНК, а сам аналіз включає в себе ряд послідовних етапів, до яких належать денатурація або розплітання подвійної спіралі ДНК, відпал праймерів і полімеризація ланцюгів ДНК, що проходять при різних температурних режимах. Саме перехід від одного етапу до іншого відбувається за рахунок зміни температурного режиму в суміші та забезпечує багаторазове збільшення числа копій специфічної ділянки, наприклад, геномної ДНК вірусу, що каталізується ферментом ДНК-полімеразою.

Як правило, весь процес відбувається в пробірці, в циклічному режимі контрольованого молекулярного копіювання певної ділянки ДНК. Кожний цикл ампліфікації має три етапи (рис. 1.6).

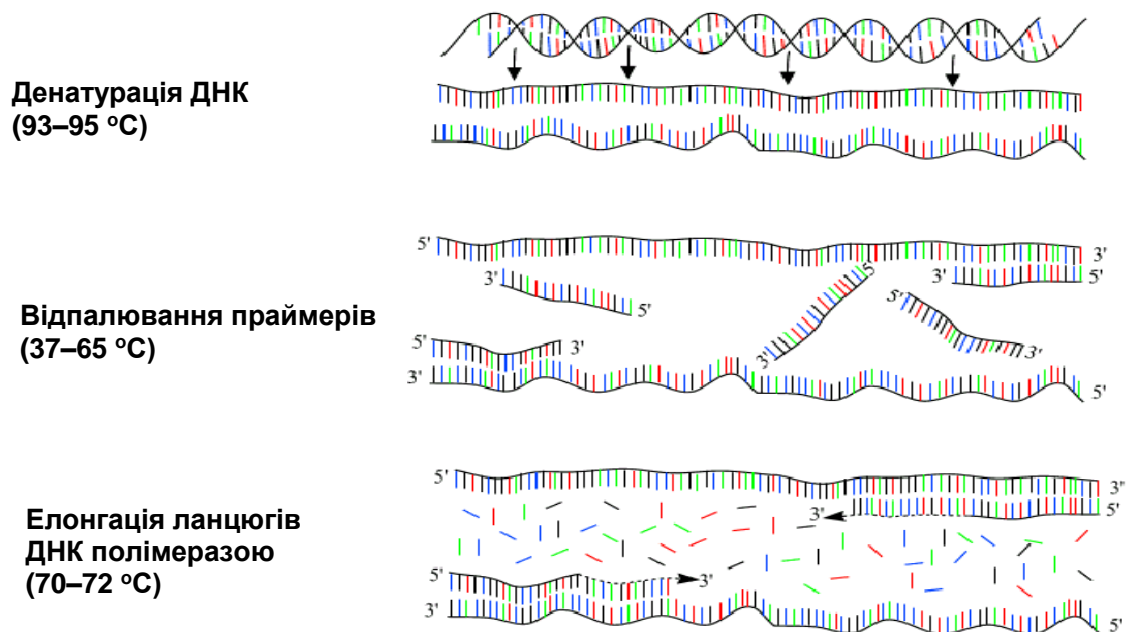


Рис.1.6. Етапи постановки ПЛР [165]

На часі, розроблено ряд комерційних тестових систем, більшість з яких здатні якісно виявити бокавіруси людини (див табл. 1.1.).

Таблиця 1.1

Методичні підходи та варіанти ПЛР для виявлення бокавірусів людини

Автор, рік проведення дослідження	Кількість досліджених зразків та позитивні результати у %	Біоматеріал для дослідження	Метод ПЛР (варіант методу)	Мішень для ПЛР	Застосована тест-система
L. Xu 2012 [166]	3460 (67,4 %)	Мазки із носу	ПЛР з «гарячим стартом» (Hot-start PCR)	Inf-A, Inf-B, Inf-C, HPiV1-4, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	QIAamp MiniElute Virus Spin (QIAGEN, Німеччина) Праймери від компанії «Invitrogen, Life Technology», (США)
Y. Deng 2012 [167]	186 (24,6 %)	Мазки із носу	ПЛР у режимі реального часу	Inf-A, Inf-B, HPiV1-4, HRV, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	QIAamp DNA mini kit «Qiagen», (США)
V. Schildgen 2013 [168]	60 (18,0 %)	Мазки із носу	ПЛР у мультиплексному форматі	Inf-A, Inf-B, HPiV1-4, HRV, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	Maxwell 16 FFPE tissue kit «Promega, Mannheim», (Німеччина)
J. Proenca-Modena 2014 [169]	18 (5,3 %)	Мазки із носу	ПЛР у режимі реального часу	Inf-A, Inf-B, HPiV1-4, HRV, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	AllPrep DNA minikit «Qiagen GmbH, Hilden», (Німеччина)
G. Salmón-Mulanovich 2014 [170]	568 (35,2 %)	Мазки із носу	ПЛР	HPiV1-4, HRV, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	aqMan [®] Universal PCR Master Mix Reagent kit «Applied Biosystems, Foster City», (США)
S. J. Tozer 2009 [171]	149 (25,8 %)	Мазки із носу	ПЛР	HPiV1-4, HRV, HRsV, HMpV, HCoV, HAdV, HBoV	QIAamp viral RNA kit «Qiagen, Hilden, Germany)

У дослідженні Джорджа Джерна «The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification» було

показано, що вірусне навантаження при бокавірусній інфекції у дітей становить більше $1,0 \times 10^5$ ДНК копій/мл. Такий рівень вірусного навантаження спостерігали у 42,5 % позитивних пацієнтів без розвитку клінічних симптомів захворювання. Найбільш високе вірусне навантаження виявляли в перші дні від початку захворювання у дітей з важким перебігом захворювання [172].

У лабораторній діагностиці бокавірусної інфекції крім ПЛР може використовуватись метод NASBA (Nucleic Acids Sequence Based Amplification) [173]. NASBA у реальному часі – це метод, адаптований до ампліфікації як РНК, так і ДНК і заснований на одночасній дії ферментів з трьома активностями: зворотної транскриптази, РНК-ази, РНК-полімерази. Принцип цього варіанту ампліфікації полягає у тому, що така ампліфікація є транскрипційно опосередкованою (рис. 1.7).

В ході такої ампліфікації відбувається збільшення кількості РНК, яка транскрибується зі спеціального промотора для РНК-полімерази бактеріофага Т7, не в 2, а в 1000 і більше разів за один цикл. Вказаний промотор входить до складу специфічного праймера, який приєднується у визначеному місці до РНК або ДНК мішені. Якщо первинною мішенню є РНК-матриця збудника, то на перших стадіях реакції відбувається зворотна транскрипція її, в ході якої будується ДНК-копія РНК-матриці і виникає ДНК-РНК-гібрид. Далі завдяки наявності у зворотної транскриптази РНК-азної активності матрична РНК видаляється після синтезу першого ланцюга ДНК і отже, відбувається процес «денатурації» ДНК-РНК гібриду (за рахунок гідролізу РНК), який автоматично відтворюється в кожному подальшому циклі ампліфікації.

Для добудовування другого ланцюга ДНК також використовується фермент зворотна транскриптаза, яка має і ДНК-залежну-ДНК-полімеразну активність. Таким чином, сформована дволанцюгова ДНК-копія має повноцінну структуру промотора ДНК-залежної РНК-полімерази (транскриптази) фага Т 7 для ініціації транскрипції і функціонування транскриптазного комплексу [174].

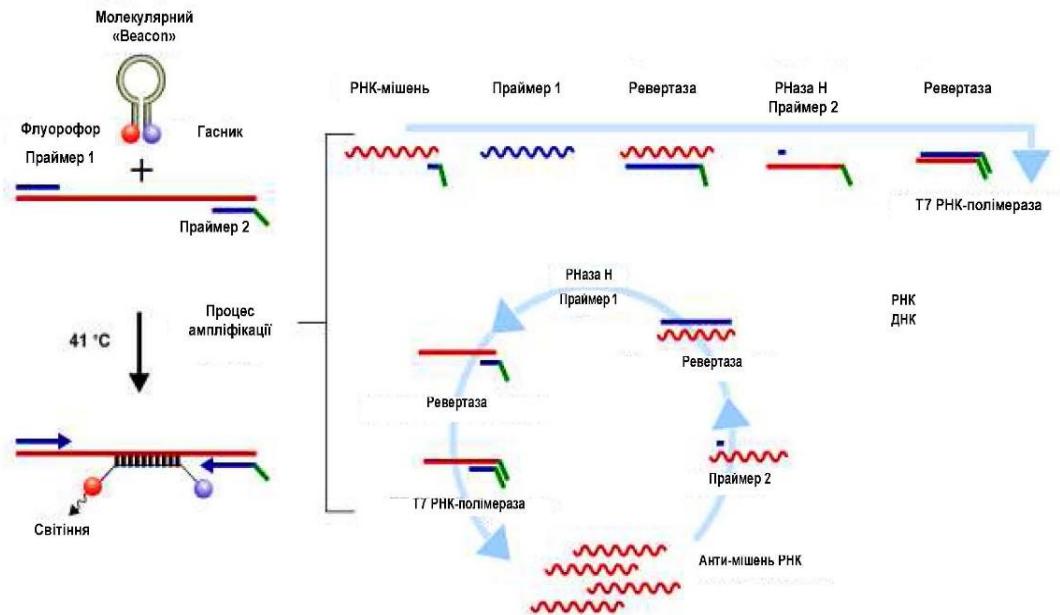


Рис. 1.7. Принцип методу NASBA [175]

Фермент ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує за один цикл (5-15 хв) 10^5 копій фрагментів РНК. Отже, протягом 40-50 хв такої ізотермічної транскрипційно опосередкованої ампліфікації ДНК або РНК в розчині утворюється 10^8 - 10^9 копій НК.

На відміну від ПЛР, NASBA базується на техніці ізотермічної ампліфікації НК, проводиться при температурі $+41^\circ\text{C}$ та дозволяє відмовитися від устаткування, яке забезпечує циклічну зміну високих температур. Праймери, цільові гени і прогнозовані розміри амплікону, що використовуються для виявлення бокавірусів людини методами NASBA та ПЛР .

В РФ розроблено та впроваджено в практику охорони здоров'я діагностичну тест-систему «ГРВІ-Скрин-FL» для виявлення 12 респіраторних вірусних збудників методом мультиплексної ПЛР у режимі реального часу. Для виділення ДНК/РНК було розроблено універсальні набори реагентів «Рибо-Сорб» і «Рибо-

Преп» («AmpliSens», Росія) [176].

У 2012 році, в Новосибірську розроблено мультиплексну ПЛР тест-систему з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації для діагностики бокавірусів 2-4 генотипів з метою розширення спектру вірусів, які виявляються при ГКІ [177, 178].

В умовах широкого впровадження молекулярно-генетичних методів дослідження в лабораторну діагностику інфекційних захворювань надзвичайної ваги набуває правильний, якісний відбір біологічного матеріалу на преаналітичному етапі.

З 2005 року і по сьогодні, матеріалом для дослідження бокавірусів людини 1 типу є мазки з порожнини носу, змиви, аспірати та харкотиння.

При будь-якому вибраному методі ампліфікації нуклеїнових кислот для діагностики респіраторних вірусів, в тому числі і НВоV, одним з найважливіших факторів виступає саме правильний вибір тампонів для відбору біологічного матеріалу.

Питання про якість відбору біологічного матеріалу, його зберігання та транспортування до лабораторій вже досить давно бентежить, як науковців так і практикуючих лікарів-вірусологів. Дослідження щодо адсорбційних властивостей тампонів для відбору біологічного матеріалу вчені підняли ще у 2006 році.

Так, у 2006 році Пітером Делай і колегами з Регіональної лабораторії Гамельтона (Каліфорнія, США) досліджували адсорбційні властивості тампонів для відбору біологічного матеріалу. В своїй роботі «Comparison of Flocked and Rayon Swabs for Collection of Respiratory Epithelial Cells from Uninfected Volunteers and Symptomatic Patients», дослідники порівнювали види тампонів від різних виробників. Це були тампони з шовку («Coran Diagnostics», Каліфорнія) і з віскозного волокна («Coran Diagnostics», Каліфорнія). У дослідження було включено хворих на ГРВІ дітей різного віку. Випадковим шляхом їх було поділено на дві групи. В одній групі хворих матеріал відбирали тампонами з шовку, а в іншій групі – тампонами із віскози. Відібрані проби досліджували на наявність вірусних респіраторних збудників методом ПЛР, кількість адсорбованих клітин

підраховували в гемоцитометрі. Результат експерименту показав, що різні тампони відбирають різну кількість епітеліальних клітин при однаковій технології відбору матеріалу. Найбільше клітин було відібрано тампонами з шовку (58,6 %), значно менше – тампонами із віскози (23,9 %). Було встановлено, що вплив адсорбуючих властивостей тампонів та відібрана ними кількість клітин впливали на результати ПЛР дослідження [179].

Вченими з Китаю на чолі з Лі Лі у своїй роботі по порівнянню адсорбуючих властивостей тампонів для відбору біологічного матеріалу «Comparison among nasopharyngeal swab, nasal wash, and oropharyngeal swab for respiratory virus detection in adults with acute pharyngitis» було досліджено мазки з носу та ротоглотки і назофарингеальні змиви для виявлення респіраторних вірусних збудників у дітей хворих на ГРЗ. Мазки із носу забирали тампонами з віскози, мазки з ротоглотки – велюр-тампонами, назофарингеальні змиви відбирали назофарингеальними велюр-тампонами («Coran Diagnostics», Італія). Виявлення респіраторних вірусів здійснювали методом ПЛР. Експеримент показав, що велюр-тампони для відбору мазків із ротоглотки та назофарингеальних змивів мали найбільшу адсорбуючу здатність порівняно з тампонами із віскози [180].

Дослідники зі США порівнювали вплив не тільки адсорбуючі властивості тампонів, але й локалізацію відбору матеріалу (мазки з носу та ротоглотки) у хворих на ГРЗ немовлят. Мазки забирали стерильними тампонами із котронової фібри «Infant Mucus Extractor» («Vygon Pharmaceutiques», Франція) в універсальне транспортне середовище («Gly medium», Франція). Відбір здійснювали згідно з протоколом дослідження методом ПЛР на наявність респіраторних вірусів. В результаті дослідження встановлено, що віруси частіше виявлялися в мазках із ротоглотки ніж із носу (97 % проти 75 % випадків відповідно), а застосування тампонів із котронової фібри було найбільш безпечним та зручним при роботі з немовлятами [181].

На сьогодні, відомо багато різних молекулярно-генетичних підходів діагностики, які застосовуються для виявлення НВов в зразках біологічного матеріалу у всьому світі на всіх шести континентах.

Так в публікації Артура Брунінга і колег «Detection and monitoring of human bocavirus 1 infection by a new rapid antigen test» (2016) йшлося про розробку нового підходу до діагностики бокавірусу людини 1 типу. Дослідники використовували якісний експрес-тест *marIPOC* («ArcDia International Oy Ltd., Turku», Фінляндія) для виявлення *in vitro* антигенів до 8 респіраторних вірусів, в тому числі і НВов1. Завдяки даному тесту вченим вдалося встановити інкубаційний період бокавірусу людини терміном в 1 тиждень [182].

Серологічна діагностика бокавірусної інфекції, яка спрямована на виявлення та визначення наростання титрів антитіл, застосовується вкрай рідко. Так, для визначення специфічних антитіл до бокавірусів людини розроблені, проте обмежено використовуються методи ІФА та ІБ [183-187].

Джеймс Ліндер та колеги тестували зразки сироватки крові відібраної від дітей методом ІБ з використанням рекомбінантних капсидних антигенів НВов1: VP1 і VP2. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що 24 з 49 дітей, позитивних на ДНК НВов методом ПЛР, мали IgM, у решти дітей було виявлено IgG. Було встановлено, що високий рівень ДНК НВов свідчить про гостру первинну інфекцію, в той час як низький рівень має менше клінічне значення [188].

В публікації Джеймса Ліндера і співавторів «CD4⁺ T Helper Cell Responses against Human Bocavirus Viral Protein 2 Viruslike Particles in Healthy Adults» показано, що НВов-специфічні IgM були виявлені у дітей, з підтвердженою бокавірусною інфекцією у ПЛР, у 42 % випадків, тоді як у 52 дітей з негативним результатом досліджень методом ПЛР на НВов, IgM виявлені не були. Аналогічні результати були отримані і в групі здорових дорослих донорів крові: IgM були ідентифіковані лише у 2 (1 %) з 299 зразків сироваток [189].

Дві групи дослідників повідомили про отримання вірусоподібних частинок, утворених капсидним білком VP2 HBoV, які можуть бути використані для розробки ІФА з метою виявлення специфічних антивірусних антитіл. Високоочищені вірусоподібні частки використовувалися також для отримання кролячої антисыворотки до VP2 для подальшого використання в імунофлюоресцентному аналізі. Вчені з США зробили подібні вірусні частки на основі трьох капсидних білків – VP1, VP2 і VP3. Кроляча антисыворотка проти капсидного білку HBoV, яка не мала перехресної реактивності з аденоасоційованим вірусом 2-го типу, була використана для розробки методу ІФА [190].

Висновок до розділу 1.

Таким чином, за перші 15 років вченими було відкрито щонайменше 11 «нових» вірусних збудників ГРВІ у людини. Серед них особливу увагу приділено «новим» парвовірусам людини, які отримали назву бокавіруси людини.

Встановлено місце бокавірусів людини в сучасній класифікації вірусів, їх структура та геном, визначені особливості їх репродукції. Проте, ще багато питань не висвітлено та залишилось поза увагою дослідників, а саме, клінічне значення HBoV1, HBoV2, HBoV3 та HBoV4, питання щодо циркуляції, сезонності та вікових особливостей бокавірусної інфекції.

Через те, що бокавіруси людини були виявлені та визнані, як «нові» респіраторні збудники не так давно, то в літературних джерелах відсутні будь-які дані (дослідження) щодо біологічних та молекулярно-генетичних властивостей циркулюючих в Україні штамів HBoV.

Не описані клінічний перебіг та епідеміологічні особливості бокавірусної інфекції. Не встановлена роль бокавірусів в етіологічній структурі захворювань верхніх та нижніх дихальних шляхів у дітей та дорослих. Не розроблена та не впроваджена лабораторна діагностика HBoV.

Також нагальним залишається питання пошуку якісних тампонів для відбору біологічного матеріалу у дітей до 6 років, що дуже важливо для ідентифікації

бокавірусів у дитячого населення України метадами ПЛР. У сучасних умовах інтенсифікації та оптимізації лабораторних досліджень важливим завданням є розробка науково-обґрунтованого алгоритму етіологічної діагностики бокавірусної інфекції.

Важливим та невирішеним питанням залишається виділення бокавірусів людини в культурах клітин в умовах *in vitro*, адаптація та культивування збудника. Нова модель НВoV у культурі клітин може відкрити великі можливості для вивчення еволюції вірусів та патогенезу інфекції на клітинному рівні.

Розробка доступної моделі бокавірусної інфекції людини в умовах *in vitro* дасть у руки вчених ефективний інструмент для оцінки протівірусної дії препаратів етіотропної терапії та дезінфектантів. Бокавіруси, як і інші парвовіруси, маючи унікальний геном та високу стабільність, можуть становити надзвичайно високу небезпеку в плані контамінації вакцин та препаратів крові, що також потребує нових досліджень. На сьогодні, актуальність поглибленого вивчення бокавірусів є незаперечною.

За матеріалами розділу опубліковано праці:

1. Обертинська О. В. Бокавіруси та захворювання, що вони викликають: структура та систематика збудника, епідеміологія, клінічні прояви, особливості лікування та методи діагностики / О. В. Обертинська, Ю. О. Бойко (Соломко) // Збірник наукових праць НМАПО імені П. Л. Шупика. – К., 2014. – Вип. 23, кн. 3. – С. 626-642.

2. Дзюблик І. В. Бокавірус людини – новий інфекційний патоген в етіології гострих респіраторних захворювань / І. В. Дзюблик, О. В. Кукало, Ю. О. Соломко, С. О. Соловйов // Мистецтво лікування. – 2015. – № 1-2 (117-118). – С. 4-10.

3. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб: Навчально-методичний посібник для лікарів / І. В. Дзюблик, Н. Г. Горовенко, О. В. Обертинська, Я. О. Дзюблик, І. Г. Костенко, І. Ф. Самборська, Т. В. Степченкова, С. Г. Вороненко, О. В. Ковалюк, Ю. О. Бойко (Соломко) – К.: тов. «Велес», 2012. – 219 с.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виходячи із загальної мети і поставлених задач даної роботи, в її основу покладено принцип комплексного дослідження в якому поєднувались: експериментальні, класичні вірусологічні, молекулярно-генетичні, експрес-методи та статистичні методи дослідження.

2.1. Матеріали дослідження

2.1.1. *Культури клітин*

В роботі використано 6 ліній перещеплюваних субстрат-залежних культур клітин. Культури клітин HEP-2, HeLa, L₄₁, MDCK були одержані із банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіології імені Р. Е. Кавецького НАН України. Культури клітин ПТП та СНЕВ були отримані з Інституту ветеринарної медицини НАН України (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Перещеплювані культури клітин, що були використані в роботі

Назва культури клітин	Середовище росту, індекс проліферації (ІП)
HEP-2 (аденокарцинома гортані)	RPMI-1640 + 5 % ембріональної сироватки; ІП=4,0
HeLa (аденокарцинома шийки матки)	199 + 10 % ембріональної сироватки; ІП=5,0
L ₄₁ (моноцитарна лейкемія людини)	RPMI-1640 + 10 % ембріональної сироватки; ІП=5,0
MDCK (нирка собаки)	ІГЛА MEM + 10 % ембріональної сироватки; ІП=4,0
СНЕВ (свиняча нирка ембріональна версенізована)	RPMI-1640 + 10 % ембріональної сироватки; ІП=5,0
ПТП (культура тестикул поросят)	RPMI-1640 + 10 % ембріональної сироватки; ІП=5,0

Ведення культур клітин здійснювали при стаціонарному культивуванні у полістиролових матрасах «Sarstedt» та планшетах (США) у ростовому живильному середовищі з додаванням сироватки крові ембріонів корів («Sigma», США). Антибіотики використовували в кінцевій концентрації 100 Од/мл для пеніциліну та 100 мкг/мл для стрептоміцину. Застосовували для зняття культури з полістиролового матрасу 0,02 % розчин Версену (рН 7,2–7,4).

2.1.2. Барвники

Для фарбування препаратів клітинних культур використовували барвник Acridine Orange (0,1г), буфер розчин – Acetate Buffer, 0.5М (1000 мл), «Хлорантоїн» («Хім-Екватор», Україна).

2.1.3. Обладнання для проведення робіт з культурами клітин

Для роботи з культурами клітин і вірусами використовували: ламінарний бокс «Jouan» (MSC9); інвертований мікроскоп «Биолам П-1»; дослідницько-універсальний мікроскоп Axiovert 200/200M виробництва («Carl ZEISS», Німеччина); CO₂-інкубатор; флуоресцентний мікроскоп «Primo Star FL LED» на базі світлодіодів з галогеновим та світлодіодним освітленням («Carl ZEISS», Німеччина).

2.1.4. Інструменти для відбору біологічного матеріалу

Для відбору зразків біологічного матеріалу (мазки з порожнини носу хворих) для дослідження методом ПЛР використовували тампони: велюр-тампони «FLOQ Swab» («COPAN», Італія) (рис. 2.1. а), цитощітки «ЗГУ-ЦМ» («Центрмед», Росія) (рис. 2.1 б) та тампони з віскози «JS» («Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd», Китай) (рис. 2.2 (а) та (б)).

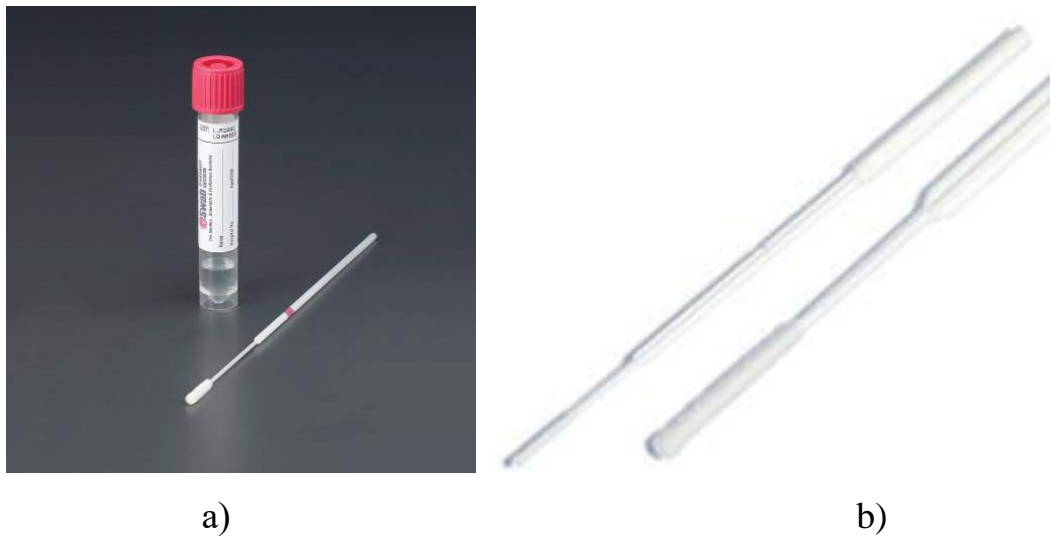


Рис. 2.1. Тампони для відбору мазків з порожнини носу
 а) велюр-тампон «FLOQ Swab» («COPAN», Італія), б) цитощітка «ЗГУ-ЦМ»
 («Центрмед», Росія)



Рис. 2.2. Тампон для відбору мазка із порожнини носа «JS»
 («Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd», Китай)

2.1.5. Транспортне середовище

Для транспортування біологічних зразків використовували транспортні середовища: універсальне транспортне середовище «UTM for the Collection and Preservation of Virus, Chlamidia, Mycoplasma, Ureaplasma» («Copan Diagnostics», Італія) див. рис. 2.3 і рис. 2.4 «Транспортне середовище для зберігання респіраторних мазків» («AmpliSens», Росія).



Рис. 2.3. Універсальне транспортне середовище «UTM for the Collection and Preservation of Virus, Clamidia, Mycoplasma, Ureaplasma» («Coran Diagnostics», Італія)

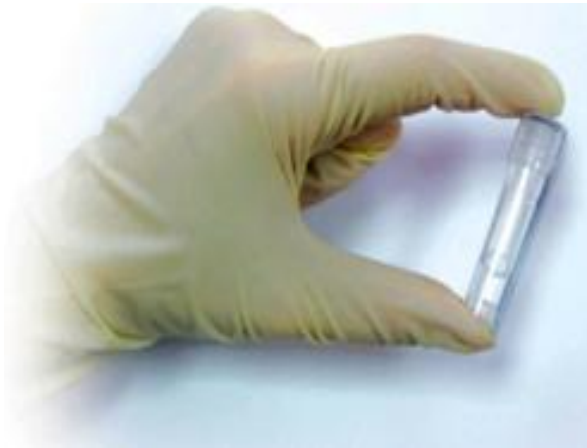


Рис. 2.4. Транспортне середовище для зберігання респіраторних мазків («AmpliSens», Росія)

2.1.6. Набори для виявлення НВоV

Для виділення бокавірусу людини та інших респіраторних вірусів застосовували набори реагентів: «Рибо-преп» («AmpliSens», Росія), «Nucleo Spin Dx Virus, VACHERY-NAGEL™» («Segene», Корея). Для зворотної транскрипції застосовували набори «Реверта-L» («AmpliSens», Росія) і «cDNA Synthesis Premix V1.1» («Segene», Корея). Ампліфікацію виділених зразків здійснювали за допомогою наборів: «ГРВІ-Скрин-FL-варіант-FRT» («AmpliSens», Росія), «Anyplex II RV 16 Detection (1.1)» («QIAGEN», Корея), «M. pneumonia LC PCR Kit»

(«Segene», Корея), «С. pneumonia LC PCR Kit» («Segene», Корея). Валідацію отриманих результатів дослідження здійснювали на приладах: для тест-систем «AmpliSens» застосовували Rotor Gene 6000 («Corbett Research», Австралія) для тест-систем «Segene» використовували CFX 96 («Bio-Rad», США).

2.1.7. Набори реагентів для генотипування НВов

Для вивчення генетичних особливостей НВов1 застосовували набір реагентів від компанії «CerTest», (Іспанія). Для виділення ДНК НВов1 використовували набір «Viasure RNA-DNA Extraction Kit», а для ампліфікації «Vocavirus «Vocavirus Viasure Real Time Detection Kit»». Валідацію результатів дослідження здійснювали за допомогою програми «Vocavirus Viasure Real Time» і приладу IQ 5 («Biorad», США).

Для характеристики генотипу НВов людини використовували метод Сенгера. Для проведення дослідження застосовували набори реагентів: «Big Dye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США); «Big Dye Terminator 5X Sequencing Buffer» («Applied Biosystems», США), використовували секвенатор «PacBio RS II» (США).

2.1.8. Експрес-тести (ІХА-тести)

В роботі використовували експрес-тести на основі імунохроматографічного аналізу (швидкі ІХА-тести): «Cito Test Influenza A&B», «Cito Test Adeno Respi», «Cito Test HRsV Blister» («Фармаско», Україна); «Alere Binax NOW Streptococcus pneumoniae» і «Alere Binax NOW Legionella» («Alere», Іспанія).

2.1.9. Обладнання для молекулярно-генетичних досліджень

Ламінарний бокс для проведення екстракції вірусів БВВ п-01-«Ламінар-С»; відсмоктувач хірургічний ОХ-10 М; термостат TDB-120; центрифуги: «Fuga/Vortex Micro-spin FV-2400» та «Multi-spin MSC-6000», центрифуга «Mini-spin + erpendorf»; термостат чотириканальний ТП4 ПЛР-01 – «Терцик» - МС2; холодильник класу «Snaigeclass A», (Україна); камера глибокої заморозки «Liebherr», (Німеччина).

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Ведення субстратзалежних перещеплюваних культур клітин

Ведення субстратзалежних перещеплюваних культур клітин здійснювали макро- і мікрометодом, як описано [191].

Для експериментальних досліджень культури клітин вирощували у культуральних планшетах на скляних або полістиролових покривних скельцях при температурі 37° С в атмосфері 5 % CO₂ впродовж 18-24 годин.

2.2.2. Метод фарбування клітинних моношарів

В роботі застосовували гісто-хімічний метод фарбування клітинних моношарів акридиновим помаранчевим з наступним імунофлюоресцентним дослідженням під люмінесцентним мікроскопом. Для цього, після формування моношарів клітин середовище росту або вірусовмісну рідину із лунок планшета видаляли, клітини промивали фізіологічним розчином та фіксували. Клітини фіксували послідовно двічі у 70 % водному розчині етилового спирту упродовж 5 хвилин та один раз у 96 % етиловому спирті впродовж 5 хвилин. Далі, клітини фарбували 0,01 % водним розчином акридинового помаранчевого впродовж 10 хвилин при кімнатній температурі. Пофарбовані клітинні моношари двічі промивали у дистильованій воді, підсушували і монтували на предметні скельця, герметизуючи їх парафіном.

2.2.3. Полімеразна ланцюгова реакція у мультиплексному форматі

ПЛР у мультиплексному форматі в режимі реального часу на бокавірус та інші респіраторні віруси здійснювали в три етапи: виділення вірусної нуклеїнової кислоти, реакція зворотної транскрипції, ампліфікація.

При роботі з тест-системою «АмпіСенс» на 12 збудників (риновірус, респіратоно-синцитіальний вірус, мета-пневмовірус, віруси парагрипу 1, 2, 3, 4 типів, коронавіруси, аденовіруси В, С, Е типів та бокавірус людини) виділення вірусної нуклеїнової кислоти проводили із застосуванням набору реагентів «Рибо-преп» («AmpliSens», Росія). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою набору реагентів «Реверта-L» («AmpliSens», Росія).

Ампліфікацію здійснювали за допомогою набору реагентів «ГРВІ-Скрин-FL-варіант-FRT» («AmpliSens», Росія). Валідацію результатів проводили на приладі Rotor Gene 6000 («Corbett Research», Австралія).

При застосуванні тест-системи «Seegene» на 16 вірусних респіраторних вірусних збудника (віруси грипу А і В, респіратоно-синцитіальні віруси типів А, В, аденовірус, метапневмовірус, коронавіруси типів 229Е, NL63, OC43, віруси парагрипу 1, 2, 3, 4 типів, риновіруси типів А, В, С, та бокавіруси 1, 2, 3, 4 типів) для виділення вірусної нуклеїнової кислоти застосовували набір реагентів «NucleoSpin Dx Virus, VACHERY-NAGEL™» («Seegene», Корея).

Реакцію зворотної транскрипції здійснювали набором «cDNA Synthesis Premix V 1.1» («Seegene», Корея), а ампліфікацію - набором «Anyplex II RV 16 Detection (1.1)» («Seegene», Корея). Валідацію результатів проводили на приладі CFX 96™ («Bio-Rad», США).

Дану методику застосовували для встановлення ролі бокавірусів людини в структурі ГРВІ та при інфекційному загостренні БА та БОС. Для розробки алгоритму лабораторної діагностики бокавірусної інфекції та інших респіраторних вірусів. Для встановлення адсорбуючих властивостей інструментів для відбору біологічного матеріалу для виявлення бокавірусів людини в тому числі і інших респіраторних вірусів. Для розробки методу культивування бокавірусу людини в умовах *in vitro*, а саме, для визначення ефективності даного методу на всіх етапах.

2.2.4. Полімеразна ланцюгова реакція у моноплексному форматі

Для виділення ДНК бокавірусу людини 1 типу застосовували набір «Viasure RNA-DNA Extraction Kit» («Viasure», Іспанія).

Ампліфікацію здійснювали набором «Bocavirus Real time detection kit» («Viasure», Іспанія). Валідацію результатів дослідження здійснювали за допомогою приладу IQ 5 («Biorad», США). Результати дослідження розраховували за допомогою програми, попередньо встановленої на персональний комп'ютер за допомогою приладу IQ 5 та методичних рекомендацій.

Метод застосовували для дослідження молекулярно-генетичних особливостей бокавірусної інфекції, а саме, як підтверджуючий тест на наявність НВoV1.

2.2.5. Метод Сенгера

У дослідженні застосовували метод Сенгера, для якого в обмежених умовах проводили ПЛР у присутності всіх чотирьох типів dNTP (один з них був міченим по альфа-положенню фосфату), на виході, отримали набір продуктів неповного копіювання матричного фрагменту.

Суміш очищали від незв'язаних дезоксинуклеозидтрифосфатів і ділили її на вісім частин. Після чого в "плюс" системі проводили чотири реакції у присутності кожного з чотирьох типів нуклеотидів, а у "мінус" системі – при відсутності кожного з них. В результаті, в "мінус" системі термінація відбувалася перед dNTP даного типу, а в "плюс" системі – після нього. Отримані таким чином вісім зразків розділяли за допомогою електрофорезу, "зчитували" сигнал і визначали послідовність вихідної ДНК. Цим способом була секвенована коротка ДНК фага фХ174, що складалася з 5386 нуклеотидних пар (рис. 2.3).

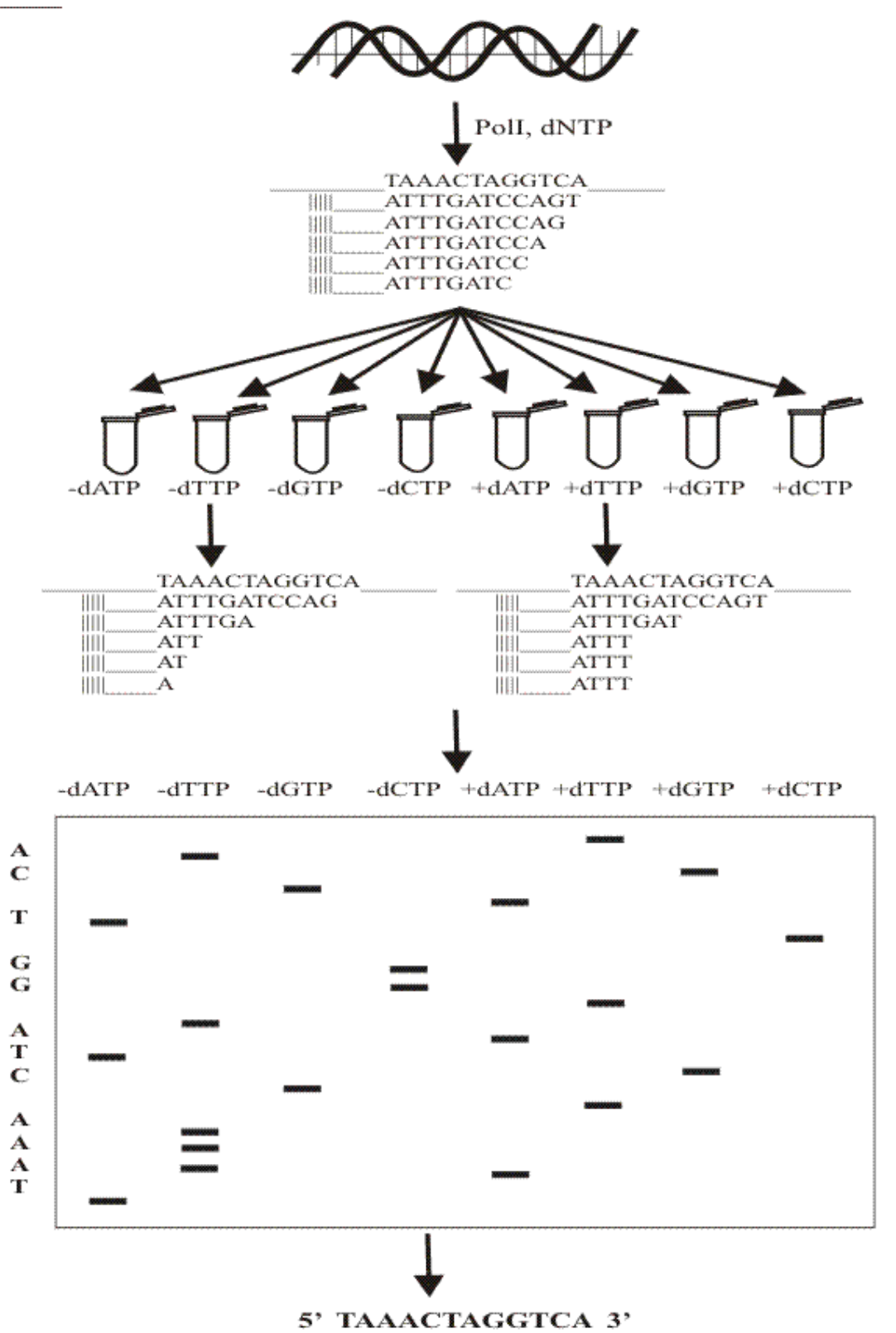


Рис. 2.3. Секвенування по Сенгеру методом «плюс-мінус» [192]

Для проведення методу Сенгера в стерильну пробірку вносили 50 нг амплікону та 3,3 пмоль праймера, далі отриману суміш висушували у вакуумному

концентраторі Concentrator 5301 («Eppendorf», Германія) при температурі 60° С. в пробірку із сухим залишком вносили 1 мкл суміші «BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit» виробництва компанії «Applied Biosystems», (США), 6 мкл «BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer» виробництва компанії «Applied Biosystems», (США) та 23 мкл бідистильованої води. Температурний профіль реакції мав наступний вигляд: 98° С – 10 с, 50° С – 5 с, 60° С – 4 хвилини протягом 25 циклів, далі фінальне прогрівання до 98° С протягом 3 хвилин та зберігання при 20° С.

Метод Сенгера застосовували для дослідження молекулярно-генетичних особливостей бокавірусної інфекції, а саме, визначення типу, який циркулює на території України.

2.2.6. Методи математичного та статистичного аналізу результатів дослідження.

Математичний і статистичний аналіз отриманих результатів досліджень здійснювали за допомогою ліцензійного програмного пакету Statistica for Windows 6.1. Оцінку достовірності отриманих результатів здійснювали за t-критерієм Ст'юдента. Для параметричних показників здійснювали розрахунок середнього арифметичного (M), помилки середньої (m). Результати оцінювали на рівні достовірності не більше $p < 0,05$ (Лапач С. Н. та співав., 2000; Атомонов М. Ю., 2006).

2.3. Характеристика обстеженої групи хворих

З 2012 по 2014 роки було обстежено 163 хворих дитини віком від трьох місяців до п'ятнадцяти років. З них, хлопчиків було 121 (74,3 %), дівчаток – 42 (25,7 %). Серед обстежених 97 дітей (59,5 %) хворіли на ГРВІ та 66 дітей (40,5 %) – на інфекційне загострення БОС. Контрольну групу склали 12 дітей I і II груп здоров'я середній вік ($36,9 \pm 3,8$) місяця. Групи були рандомізовані за статтю та віком.

Мазки з порожнини носу у хворих, які приймали участь у дослідженні відбирали двома різними тампонами з лівої ніздрі велюр-тампоном, а з правої – тампоном іх віскози. Переважно в перші 2 доби з моменту госпіталізації хворих. Відбір біологічного матеріалу здійснювали відповідно до вимог Наказу МОЗ України № 662 від 30.07.2013 року [193].

Перед проведенням досліджень, нами отримано згоду від комітету з етики НМАПО імені П. Л. Шупика (протокол засідання КЕ № 2 від 04.02.2013 р), яка дозволила відбирати матеріал від хворих з урахуванням інформованої згоди.

Батьки пацієнтів, які приймали участь у дослідженні, були проінформовані про план проведення дослідження, його мету та методи. Ними було розроблено письмову інформовану згоду відповідно до вимог «Good Clinical Practice» та діючого законодавства України з питань біоетики медичних досліджень.

У дослідження не включали хворих, батьки чи опікуни яких не дали письмової згоди. Кожному учаснику дослідження в ході експерименту присвоювали унікальний ідентифікаційний номер. Даний номер вносили до «форми обліку» [194] Конфіденційна інформація не використовувалась у звітах і публікаціях.

Кількісну складову експериментальної частини дисертаційного дослідження подано в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Обсяг виконаної роботи

Задачі	Методи	Кількість
Встановити роль бокавірусів людини в етіології ГРВІ	ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 вірусних збудників	194 мазки з носу
Встановити роль бокавірусів людини при інфекційному загостренні БА і БОС	ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 вірусних збудників	156 мазків з носу
Дослідити молекулярно-генетичні особливості бокавірусної інфекції	Метод секвенування геному НВоV1 за Сенгером	40 зразків ДНК
	Підтверджуючий тест «Bocavirus Real-Time Detection Kit»	48 зразків ДНК
Розробити та науково обґрунтувати алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції	ПЛР у мультиплексному форматі на 2 збудника (<i>S. pneumoniae</i> , <i>L. pneumoniae</i>)	78 зразків
	Швидкі ІХА-тести на виявлення: вірусів грипу А і В, Аденовірусів, РС-вірусів, <i>S. pneumoniae</i> , <i>L. pneumoniae</i>	400 тестів
Удосконалити лабораторну діагностику бокавірусної інфекції	Відбір біологічного матеріалу велюр-тампонами, тампонами із віскози, цитощітками; фарбування препаратів, світлова мікроскопія, ПЛР на 16 збудників	224 препарати
Розробити метод культивування та виділення бокавірусу людини в перещеплюваних культурах клітин в умовах <i>in vitro</i>	Культивування культур клітин: СНЕВ, МДСК, НЕР-2, HeLa, L ₄₁ , ПТП; світлова мікроскопія; люмінісцентна мікроскопія; ПЛР на 16 збудників	1728 моношарів

З метою визначення клінічних особливостей бокавірусної інфекції у дітей збирали анамнестичні дані, проводили лабораторно-інструментальні методи дослідження: загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, бактеріологічний посів та інші. Результати реєстрували в історіях хвороби

РОЗДІЛ 3

РОЛЬ БОКАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В ЕТІОЛОГІЧНІЙ СТРУКТУРІ ГОСТРИХ РЕСПІРАТОРНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У ДІТЕЙ

Відповідно до сучасних даних в Україні щорічно реєструється 4,5–5,0 мільйони випадків грипу та ГРВІ серед дітей. До найбільш поширених класичних збудників ГРВІ належать: віруси грипу, парагрипу, респіраторно-синцитіальний вірус вірус (РС-вірус), аденовіруси, риновіруси, респіраторні коронавіруси та ентеровіруси.

У даний час у світі накопичена інформація про циркуляцію НВoV1 людини. Вірус виявляли переважно у дітей з ураженням верхніх і нижніх дихальних шляхів.

Зареєстровано поодинокі випадки виявлення НВoV2 і НВoV3 у носоглоткових змивах пацієнтів із захворюваннями органів дихання.

Згідно даних зарубіжних авторів, до основних клінічних форм бокавірусної інфекції у дітей відносять: риніт, гострий катаральний отит, тонзиліт, фарингіт, ларинготрахеїт, пневмонію, бронхіоліт, бронхіт, інфекційне загострення БА та БОС.

Характерною рисою БА та БОС є варіабельність перебігу хронічного захворювання з періодичним розвитком епізодів прогресуючого наростання задишки, кашлю, появи свистячих хрипів і відчуття нестачі повітря, стиснення грудної клітки чи різної комбінації цих симптомів, які часто загрожують життю і саме через це є значною проблемою в медичній практиці.

Серед багатьох внутрішніх і зовнішніх факторів, які сприяють розвитку БА чи БОС, особливе значення приділяється респіраторній вірусній інфекції, яка вважається одним з основних «тригерів» цих захворювань.

Зв'язок між ГРВІ і бокавірусами, загостренням БА/БОС і бокавірусами розглядається в нашому дослідженні з точки зору уточнення ролі бокавірусів людини, як «нових» респіраторних збудників, в етіологічній структурі захворювань органів дихання у дітей в Україні.

3.1. Роль бокавірусів людини в етіологічній структурі ГРВІ у госпіталізованих дітей

Досліджували роль бокавірусів людини в етіологічній структурі ГРВІ за період з жовтня 2012 року по грудень 2014 років.

Обстежено 97 дітей віком від 3 місяців до 15 років, у середньому ($39,5 \pm 2,5$) місяця, які знаходилися на лікуванні в інфекційному відділенні у Львівській дитячій міській клінічній лікарні. Серед них хлопчиків було 51 (52,6 %), а дівчаток – 46 (47,4 %).

Госпіталізованих пацієнтів рандомізовано за віком на чотири групи: перша група налічувала 12 дітей віком від 3 місяців до 1 року (12,4 %), друга – нараховувала 67 дітей віком 1-3 роки (69,0 %), третя - 10 дітей 3-5-річного віку (10,4 %) і четверта - 8 дітей старше 5 років (8,2 %).

Усім хворим проводили відбір біологічного матеріалу, при поступленні до стаціонару. Також їх проводили загально-клінічні, бактеріологічні та молекулярно-генетичні дослідження (розділ 2 «Матеріали і методи»).

За результатами досліджень, встановлено, що в етіологічній структурі ГРВІ, у дітей було виявлено респіраторні віруси в 53,6 % випадків.

Встановлено, що значну перевагу серед виявлених респіраторних вірусних збудників в етіологічній структурі ГРВІ мали бокавіруси людини (42,3 %). Дещо з меншою частотою виявляли віруси парагрипу (21,2 %), аденовіруси (19,2 %), риновіруси (9,7 %), РС-віруси та метапневмовірус по 3,8 % відповідно (рис. 3.1).

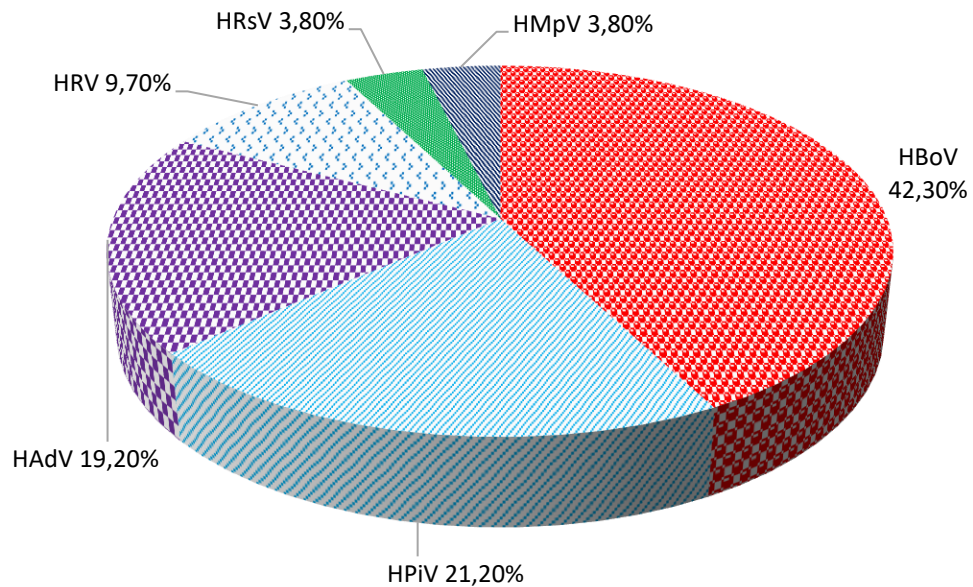


Рис. 3.1. Етіологічна структура ГРВІ у дітей за період з 2012 по 2014 роки (результати наведені у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків)

Бокавірусну моно-інфекцію визначали в 45,5 %, а мікст-інфекцію («бокавірус + риновірус», «бокавірус + аденовірус») у 54,5 % випадків.

Досліджували частоту виявлення бокавірусів в етіологічній структурі ГРВІ у дітей різних вікових груп.

Для цього дітей було рандомізовано за віком на 4 групи: перша група – діти від 4 місяців до одного року життя, друга – від 1 до 3 років життя, третя – діти віком від 3 до 5 років і в останню четверту групу увійшли діти старші 5 років (дошкільнята: 5-7 років). Такий розподіл дітей на групи обумовлений нагальною потребою в подальшому порівнянні наших результатів дослідження з результатами інших авторів. Особливості етіологічної структури ГРВІ у дітей чотирьох вікових груп наведені на рис. 3.2.

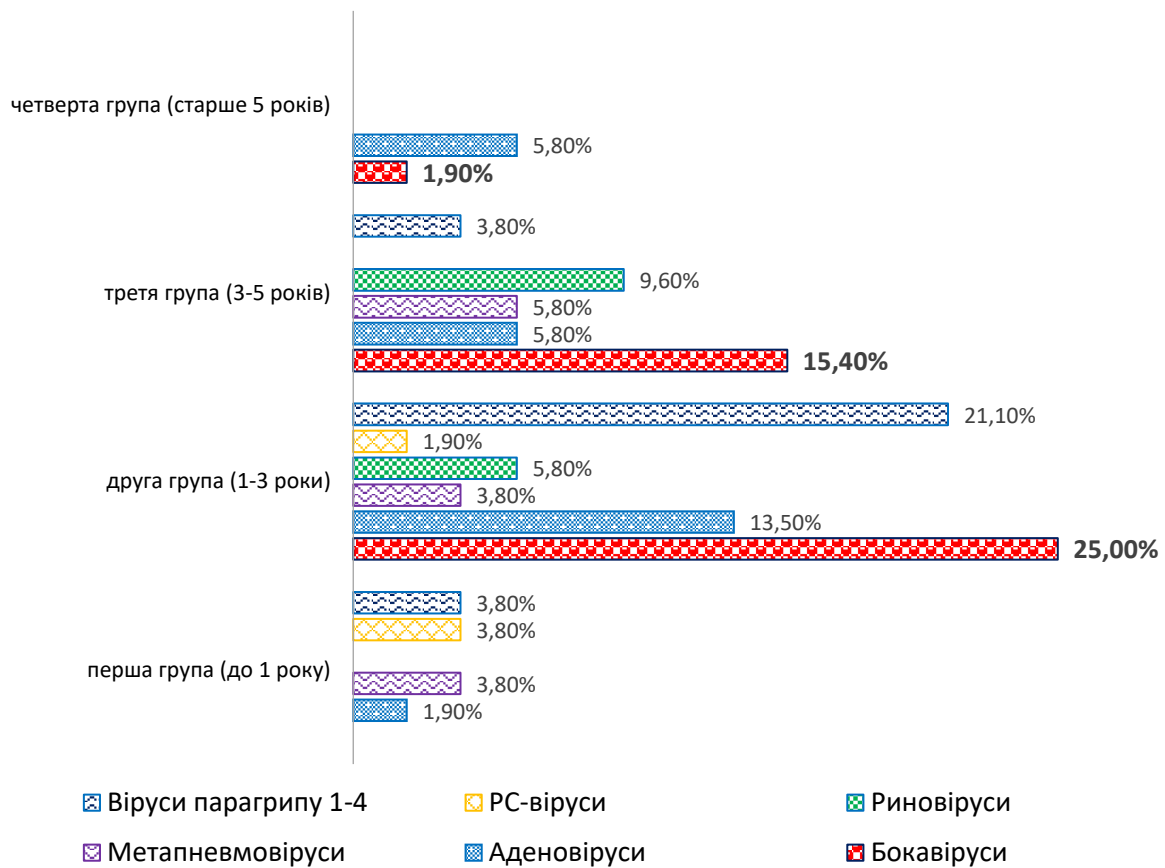


Рис. 3.2. Особливості етіологічної структури ГРВІ у дітей різних вікових груп (результати наведені у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків)

Як видно із наведених даних, у першій групі дітей (до 1 року) в структурі ГРВІ були виявлені РС-віруси, метапневмовіруси та віруси парагрипу (по 3,8 % від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків) та аденовіруси в 1,9 % випадків. Бокавіруси не були ідентифіковані у жодному випадку.

У другій групі від 1 до 3 років, бокавіруси людини було виявлено у 25,0 % випадків, віруси парагрипу 1-4 типів у 21,1 %, аденовіруси у 13,5 %, риновіруси – 5,8 %, метапневмовірус – 3,8 %, а РС-вірус у 1,9 % випадків.

В третій групі дітей віком від 3 до 5 років, бокавірус був виявлений у 15,4 %, риновіруси – 9,6 %, аденовіруси та метапневмовіруси по 5,8 %, а віруси парагрипу у 3,8 % випадків.

У четвертій групі дітей старше 5 років протягом всього періоду спостереження реєструвався лише аденовірус у 5,8 % випадків та бокавірус людини у 1,9 % випадків, інші збудники ГРВІ виявлено не було.

Як видно з представлених даних, найбільш часто бокавірусну інфекцію було виявлено у дітей другої групи. Бокавірус не виявляли в першій групі дітей до 1 року.

Оцінюючи особливості клінічного перебігу бокавірусної інфекції, нами відмічено, що більшість пацієнтів госпіталізовані на 6-18 годину від початку захворювання. Причинами звернення до стаціонару були: утруднене дихання, задишка, неспокій, висока температура тіла, сильний кашель.

Основні симптоми ГРВІ у дітей з бокавірусною інфекцією в залежності від віку і статі представлено на рис. 3.3.

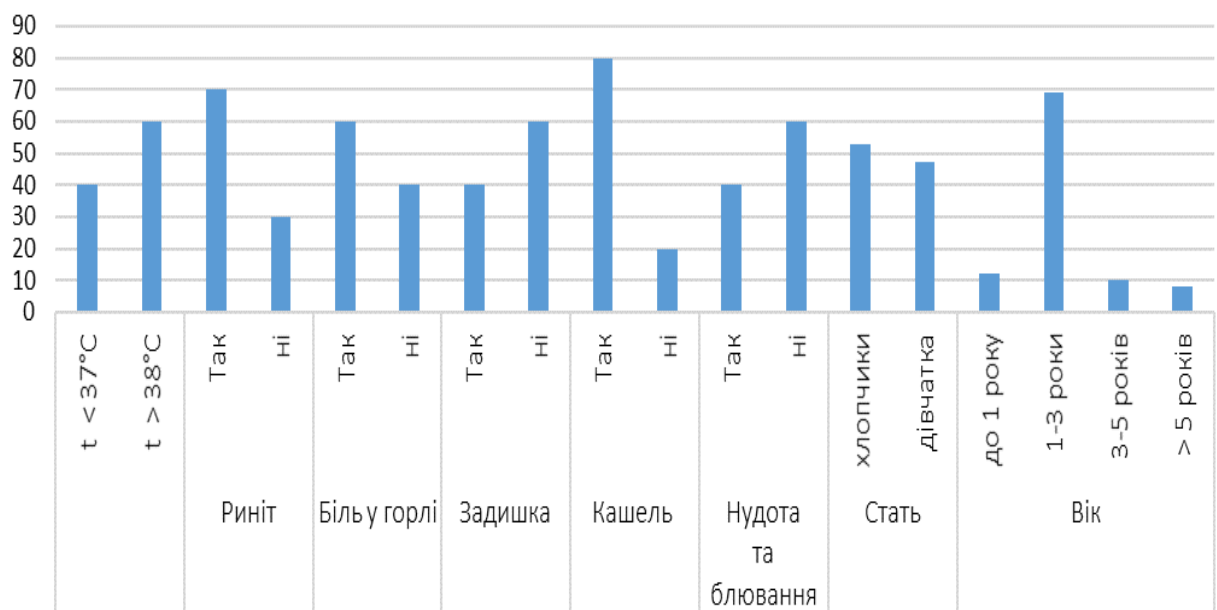


Рис. 3.3. Основні симптоми ГРВІ у дітей з бокавірусною інфекцією в залежності від віку і статі (результати наведені у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків)

Оцінюючи особливості клінічного перебігу бокавірусної інфекції було відмічено, що більшість пацієнтів госпіталізовані на 6-18 годину від початку захворювання. Причиною звернення до стаціонарів було: утруднене дихання, задишка, неспокій, висока температура тіла, сильний кашель.

За результатами проведеного дослідження, можна підвести підсумок, нами встановлено роль бокавірусу людини в етіологічній структурі ГРВІ у дітей. Бокавірус людини виявляли в структурі ГРВІ у 42,3 % від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків.

Було виявлено бокавірусну моно-інфекцію у 45,5 % випадків, а бокавірусну мікст-інфекцію у 54,5 % випадків. Визначали вірусно-вірусну мікст-інфекцію: «бокавірус + риновірус», «бокавірус + аденовірус», «бокавірус + риновірус + аденовірус».

Встановлено, що найбільш уразливими до НВoV виявились діти другої групи від 1 до 3 років, збудник було виявлено у 25,0 % випадків.

Оцінювали клінічні особливості перебігу бокавірусної інфекції у дітей з ГРВІ: утруднене дихання, задишка, неспокій, висока температура тіла, сильний кашель.

3.2. Роль бокавірусів людини при інфекційному загостренні бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у госпіталізованих дітей

З лютого 2012 року по квітень 2013 року обстежено 66 дітей віком від 3 місяців до 6 років середній вік пацієнтів становив $(36,3 \pm 2,5)$ місяців, госпіталізованих до Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» в період з 2012-2013 роки.

З діагнозом БА у дослідження включено 28 осіб (42,4 %), а з БОС – 38 осіб (57,6 %). Серед них хлопчиків було 46 (69,7 %), а дівчаток – 20 (30,3 %).

Методом рандомізації, діти були розподілені на чотири групи за віком. Першу групу склали 17 осіб віком до 1 року, другу - 21 особа віком від 1 до 3 років, третю – 23 дитини від 3 до 5 років, четверту – 5 осіб старше 5 років. У контрольну

групу війшли 12 дітей I і II груп здоров'я. Всього було обстежено 78 дітей.

Відбір мазків з порожнини носа та загально-клінічні дослідження виконували, як це описано в другому розділі «Матеріали та методи дослідження».

Діагноз БА встановлювали відповідно до Наказу МОЗ України № 767 від 27.12.2005 року «Про затвердження протоколів діагностики та лікування алергологічних хвороб у дітей» та № 868 від 08.10.2013 року «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі».

Для виявлення вірусних респіраторних збудників, в тому числі, бокавірусів людини застосовували ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 збудників (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

**Результати досліджень зразків біологічного матеріалу методом ПЛР
у мультиплексному форматі в режимі реального часу у дітей
із інфекційним загостренням БА та БОС**

Показник	Бронхіальна астма (n=28)		Бронхообструктивний синдром (n=38)	
	абс.ч	%±m %	абс.ч	%±m %
Бокавірус	15	53,6±9,4	7	18,4±6,3
Аденовірус	4	14,3±6,6	2	5,3±3,6
Метапневмовірус	1	3,6±3,5	4	10,5±4,9
Риновірус	2	7,1±4,8	4	10,5±4,9
РС-вірус	5	17,8±7,2	4	10,5±4,9
Віруси парагрипу 1–4	1	3,6±3,5	2	5,3±3,6
Не виявлено	0	0	15	25,9±7,1

Етіологічна структура вірусних збудників у дітей при інфекційному загостренні БА (а) та БОС (b) представлена на рис. 3.4.((a) та (b)).

В результаті ПЛР-дослідження БА виявлено HBoV у 53,6 %, HRsV – 17,8 %, HAdV – 14,3 %, HRV – 7,1 %, а HMPV і HPiV по 3,6 % випадків.

У пацієнтів із БОС HBoV був ідентифікований у 30,4 % випадків, HRsV, HRV та HMPV - у 17,4 % відповідно, а HAdV і HPiV - у 8,73 % випадків відповідно.

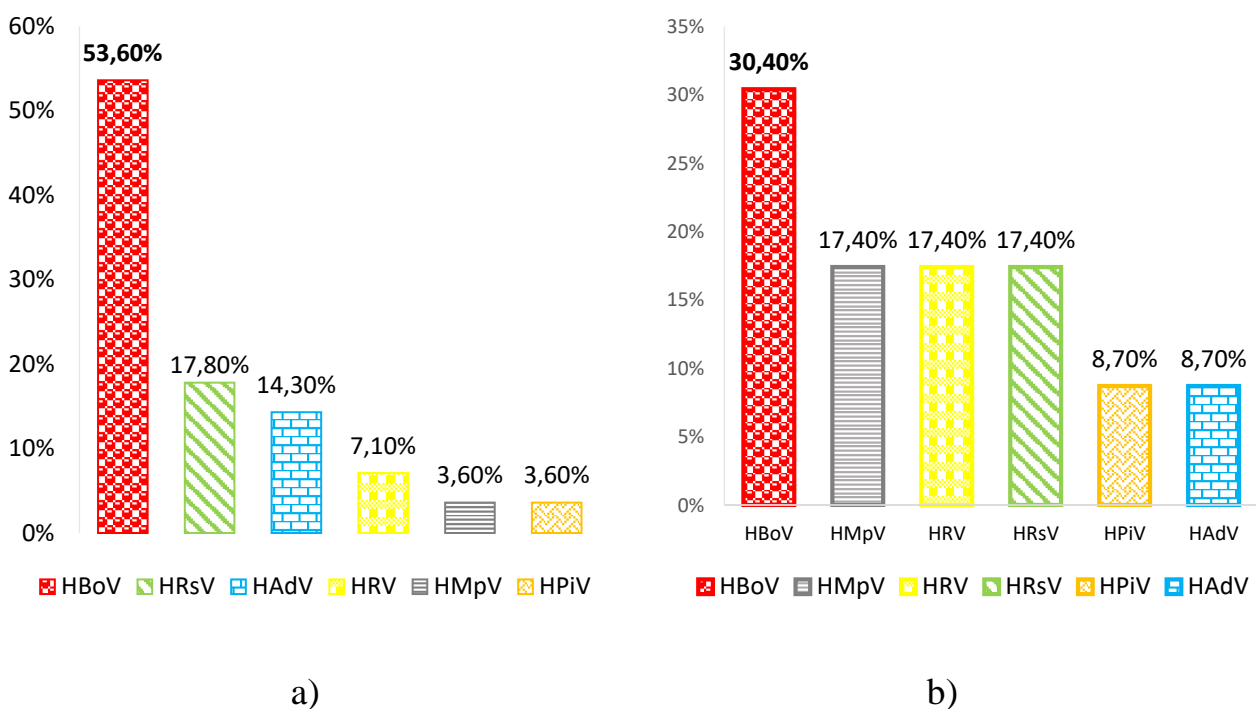


Рис. 3.4. Етіологічна структура вірусів при інфекційному загостренні БА (а) та БОС (b) (дані наведені у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків)

Особливості етіологічної структури інфекційного загострення БА та БОС у дітей різних вікових груп з 2012 по 2013 роки наведені на рис. 3.5.

В результаті проведеного дослідження встановлена чітка залежність індикації бокавірусу в залежності від віку дитини, так у першій віковій групі HBoV людини виявляли в 7,1 % випадків, у другій групі в 23,8 %, у третій групі в 19,0 %, а в четвертій – його взагалі не виявляли.

Серед хворих з інфекційним загостренням БА та БОС у яких виявляли бокавірус людини, моно-інфекцію встановлено у 86,4 % випадків, а мікст-інфекцію («бокавірус + риновірус + аденовірус» і «бокавірус + РС-вірус + аденовірус») – у 13,6 % випадків.

Попередній аналіз показав, що частота епізодів ГРВІ у хворих на БА становила ($1,5 \pm 0,2$ епізоду) і була практично такою ж ($p > 0,05$), як і у дітей ($1,6 \pm 0,3$ епізоду).

Середній вік появи перших епізодів ГРВІ у дітей з БА складав ($21,0 \pm 1,5$) місяця, а у дітей з БОС – ($21,7 \pm 1,1$) місяця, що свідчило про ранню маніфестацію хвороби.

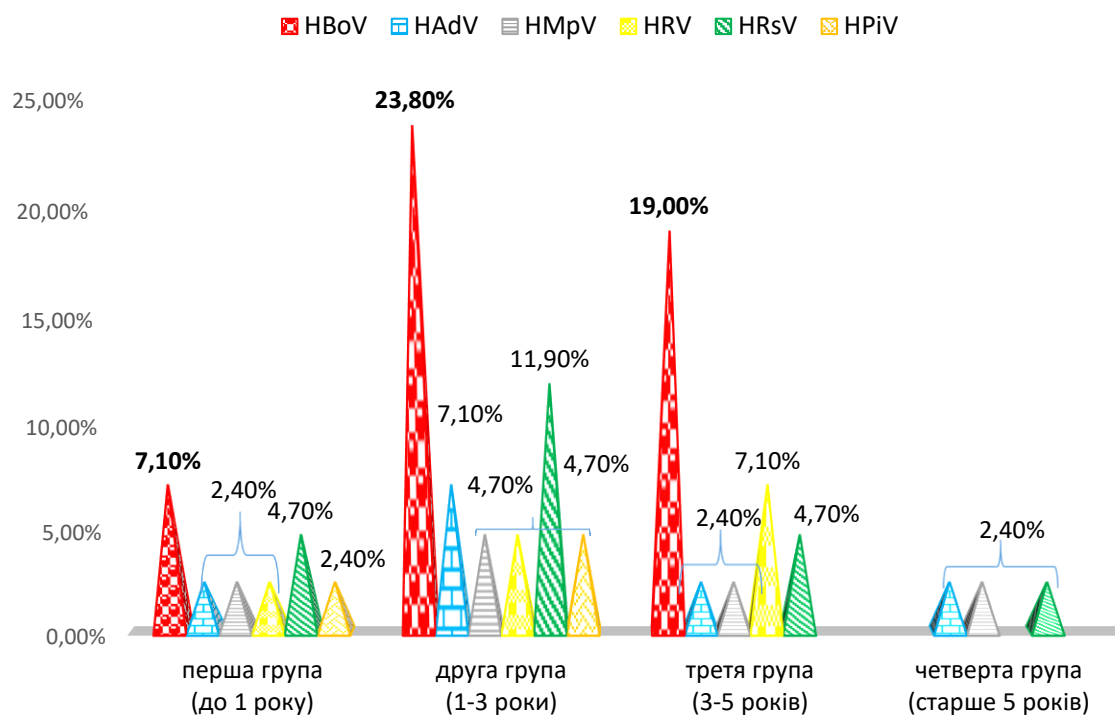


Рис. 3.5. Особливості етіологічної структури інфекційного загострення БА та БОС у дітей різних вікових груп за весь період спостереження (у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених результатів)

Час, що проходив від маніфестації ознак БА до встановлення діагнозу, в середньому становив ($19,7 \pm 1,6$) місяця, що пов'язано з труднощами встановлення діагнозу у ранньому віці. Вікові особливості частоти основних клінічних симптомів

хвороби наведено у табл. 3.2.

Як видно з таблиці, у всіх вікових групах були відмічені катаральні явища різних ступенів важкості. Достовірних відмінностей по частоті виявлення таких симптомів, як закладеність носа та ринорея не було виявлено ($p>0,05$). Гіперемію зіву відмічали в кожній віковій групі і особливо часто у пацієнтів віком від 3 до 5 років.

Наведені дані свідчать про те, що за клінічними симптомами встановити причину захворювання немає можливості, що підкреслює необхідність лабораторної ідентифікації збудника інфекції.

Проводилась ідентифікація таких респіраторних патогенів, як віруси парагрипу, аденовіруси, риновіруси, метапневмовірус і бокавірус по раках. Так, у 2012 році респіраторні віруси були виявлені в $(72,2\pm 5,3)$ % випадків, у 2013 році – в $(53,6\pm 7,8)$ %, у 2014 році – в $(52,0\pm 7,1)$ % випадків.

Таблиця 3.2

Характеристика основних клінічних симптомів ($M\pm m\%$), бокавірусної інфекції у дітей із загостренням БА та БОС в залежності від віку

Клінічні симптоми	Вік обстежених дітей			
	до 1 року n=17	1-3 роки n=21	3-5 років n=23	старше 5 років n=5
Закладеність носа	88,2±7,8	90,5±6,4	91,3±5,8	60,0±21,9
Ринорея	52,9±12,1	85,7±7,6	73,9±9,2	40,0±21,9
Гіперемія зіву	47,0±12,1	52,4±10,8	86,9±7,0	60,0±21,9
Кашель	17,6±9,2	61,9±12,0	65,2±9,9	20,0±17,9
Ядуха	35,3±11,6	23,8±9,3	13,0±7,0	-

Встановлено, що в різні роки серед всіх респіраторних вірусів частота виявлення бокавірусу при моно-інфекції варіювала в межах від $(8,5\pm 5,4)$ % до $(36,5\pm 6,7)$ %, а при мікст-інфекції - $(8,0\pm 5,5)$ % до $(21\pm 5,6)$ (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Частота виявлення бокавірусної моно- і бокавірусної мікст-інфекції та інших респіраторних вірусів у дітей за період спостереження по роках

Рік	Кількість обстежених хворих (n)	Загальна кількість виявлених вірусів		НВoV-моно інфекція		НВoV-мікст інфекція	
		абс.ч	M±m%	абс.ч.	M±m%	абс. ч	M±m%
2012	72	52	72,2±5,3	19	36,5±6,7	11	21,1±5,6
2013	41	22	53,6±7,8	8	36,4±10,2	2	9,1±3,0
2014	50	25	50,0±7,1	2	8,0±5,4	2	8,0±5,5

Отримані нами дані не зовсім узгоджуються з результатами закордонних досліджень, в яких встановлена провідна роль РС-вірусу та риновірусу в інфекційному загостренні БА та БОС, що може бути пов'язано з особливостями циркуляції цих збудників в країні. При цьому частота виявлення поєднання мікст-інфекції бокавірусу з іншими вірусами-збудниками респіраторних захворювань людини дещо менша, ніж за даними літературних джерел в Європі.

Таким чином, підводячи підсумки під цим підрозділом важливо відмітити, що бокавіруси людини вперше були виявлені, як «тригери» інфекційного загострення Ба та БОС у дітей України в період 2012-2013 років.

Проведено ідентифікацію бокавірусу людини при інфекційному загостренні БА та БОС у дітей.

Так, при БА бокавіруси людини було виявлено у 53,6 %, РС-віруси у 17,8 %, аденовіруси – 14,3 %, риновірус – 7,1 %, а метапневмовірус і віруси парагрипу по 3,6 % випадків відповідно.

При БОС бокавіруси було ідентифіковано у 30,4 %, риновірус, РС-вірус і метапневмовірус по 17,4 %, а віруси парагрипу та аденовіруси по 8,7 % відповідно.

Бокавірусна моно-інфекція була виявлена в 86,4 % випадків, а бокавірусна мікст-інфекція «бокавірус + риновірус + аденовірусу» та «бокавірус + РС-вірус + аденовірус» у 13,6 % випадків.

Найбільш часто бокавірусну інфекцію виявляли у вікових групах від 1 до 3 років (23,8 %) і від 3 до 5 років (19,0 %).

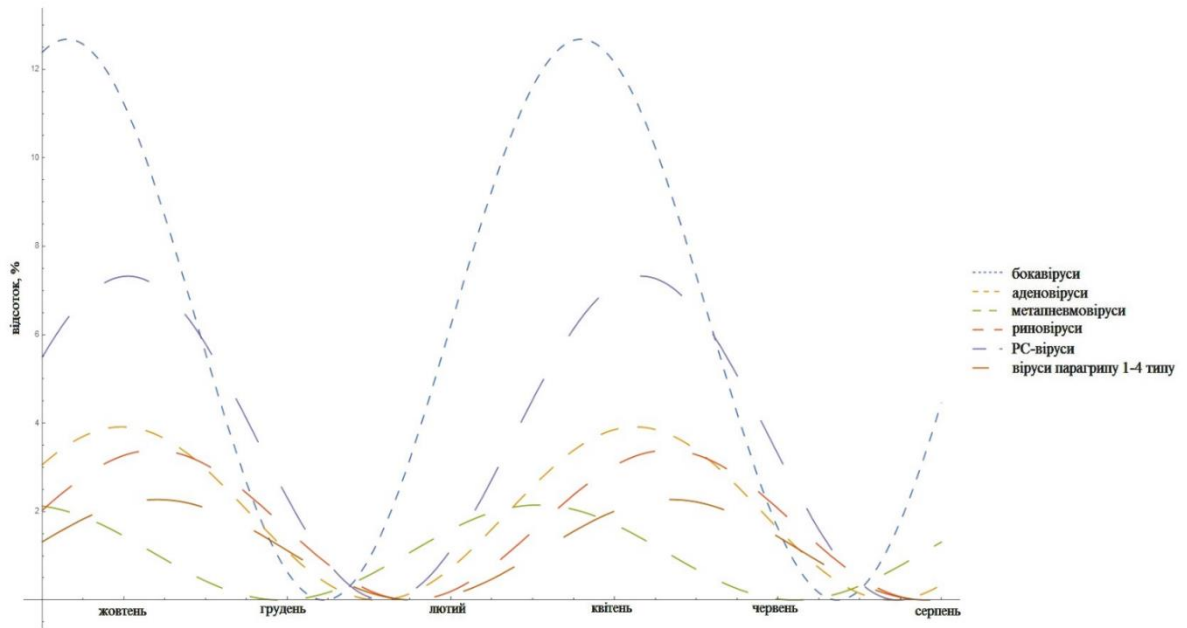
У дітей усіх вікових груп з інфекційним загостренням Ба та БОС відмічені катаральні явища різних ступенів важкості. Достовірних відмінностей по частоті виявлення основних симптомів не було виявлено ($p > 0,05$).

3.3. Епідеміологічні особливості бокавірусної інфекції

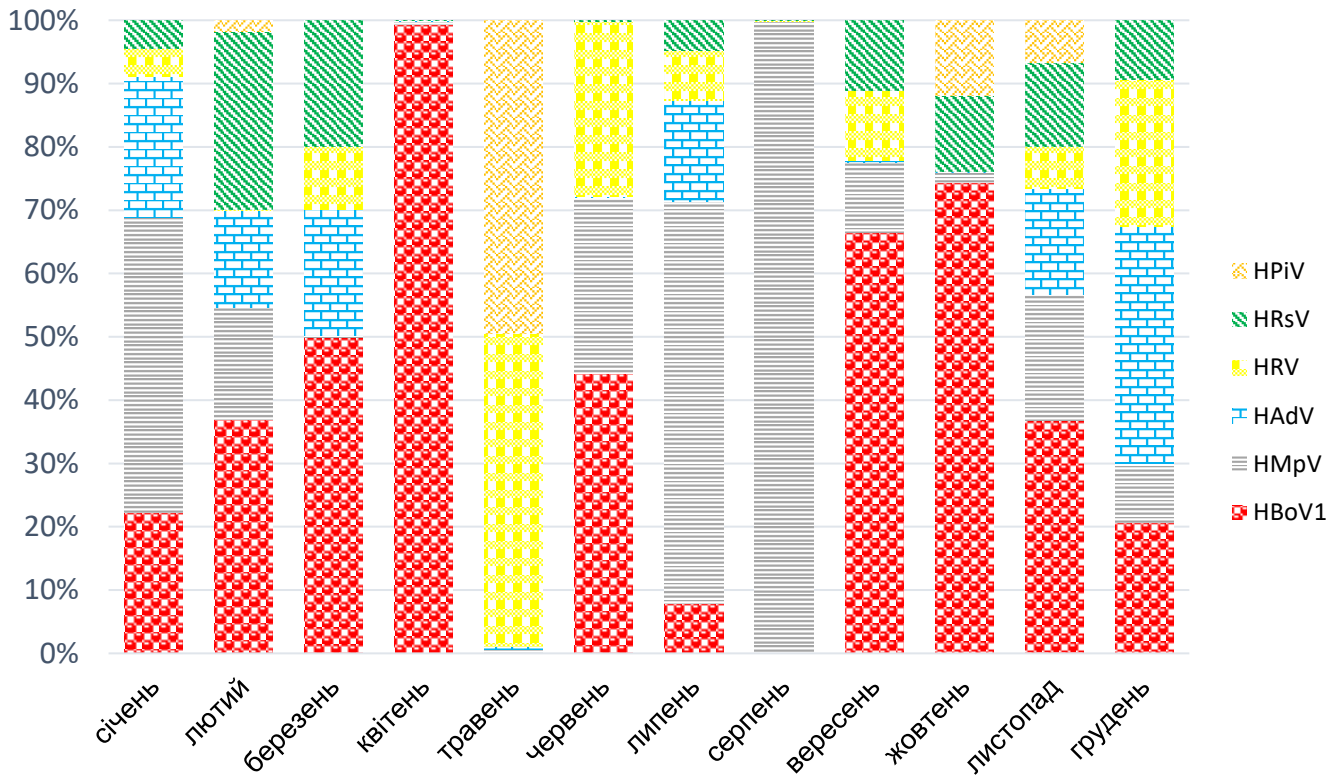
В основу цього розділу покладено узагальнені результати обстежень 163 хворих дітей, які перебували на стаціонарному лікуванні в інфекційних відділеннях з приводу захворювань ГРВІ та з інфекційним загостренням БА та БОС у 2012, 2013 та 2014 роках.

Встановлено, що з 2012 по 2014 роки в кожному епідемічному сезоні спостерігались такі респіраторні віруси, як віруси парагрипу, аденовіруси, риновіруси, метапневмовірус та бокавірус людини.

Аналіз щомісячного виявлення бокавірусної інфекції та інших респіраторних вірусних збудників за період з 2012 по 2014 роки показано на рис. 3.6. ((а) та (б)).



a)



b)

Рис. 3.6. Результати виявлення респіраторних вірусів по місяцям за період з 2012 по 2014 років (а та б)

Встановлено, що частота виявлення бокавірусу людини коливалася в широких межах упродовж року та чітко характеризувалася двома піками: один із

них припадав на вересень-жовтень, що співпадало з даними російської і білоруських вчених [195, 196], щодо циркуляції НВoV1 серед дитячого населення цих країн, а другий - на весняний період з максимальним виявленням у квітні місяці, що за даними літератури більш характерно для країн Західної Європи [197].

3.4. Молекулярно-генетичні особливості бокавірусу людини

Молекулярно-генетичні методи посідають провідне місце в діагностиці, епідеміологічному нагляді за інфекційними захворюваннями, оскільки відрізняються високою чутливістю, специфічністю, точністю та експресністю. Застосування молекулярно-генетичних методів, основаних на ампліфікації нуклеїнових кислот, зараз є особливо актуальною проблемою та дає прекрасні результати у випадках, коли вірус відноситься до важко-культивованих збудників. Так, одним із таких збудників є бокавірус людини.

На сучасному етапі розвитку науки та лабораторної діагностики розроблено та впроваджено в практику вірусологічних лабораторій провідних країн світу підходи до секвенування бокавірусів людини.

Зважаючи на те, що в Україні дослідження на виявлення бокавірусів ніколи не проводились, одним із наших завдань було знайти метод генотипування НВoV1 людини, який би був зручним у використанні та дотупним для вітчизняних науково-практичних лабораторій.

Так нами, вперше застосовано конформаційний тест виробництва іспанської компанії «CerTest Biotec^{S.L}» (Іспанія), який було ввезено до України за одноразовим дозволом для ідентифікації бокавірусу людини 1 типу.

Даний конформаційний тест, являє собою ПЛР у моноплексному форматі. Він є специфічним аналізом визначення НВoV1 людини в зразках біологічного матеріалу, а саме, в мазках із порожнини носу.

Принцип методу полягав у виділенні ДНК НВoV1 з біологічного матеріалу та ампліфікації закритої області білка NS1 з використанням специфічних праймерів і зонду з флуоресцентним маркуванням.

Набір для ампліфікації «Viasure Bocavirus Rial Time Kit» містить 6 стрипів по 8 лунок кожний. В кожен лунку стрипу внесено всі компоненти реакції (праймери, дезоксинуклеотидтрифосфати, буфер і полімераза), крім зразка (проби).

Однією з переваг даного набору є те, що він може зберігатися при температурі від -2 до 40 °С, що значно полегшує роботу ампліканта в ПЛР лабораторії.

Для встановлення генотипу бокавірусу людини, нами протестовано 9 зразків позитивних методом ПЛР у мультиплексу форматі на НВoV моно-інфекцію (табл. 3.4.).

Таблиця 3.4

Загальна кількість позитивних на НВoV моно-інфекцію зразків

№ за порядком	№ лабораторний	№ історії хвороби	Стать	Вік	НВoV-моно-інфекція
1	1-ARI/ch/2012	5068	Ж	3	НВoV
2	2-ARI/ch/2012	5115	Ч	16	НВoV
3	6-ARI/ch/2012	5202	Ч	2	НВoV
4	10-ARI/ch/2012	5223	Ч	2	НВoV
5	11-ARI/ch/2012	5270	Ч	2	НВoV
6	15-ARI/ch/2012	5283	Ч	2	НВoV
7	16-ARI/ch/2012	5307	Ч	2	НВoV
8	19-ARI/ch/2012	5315	Ж	3	НВoV
9	20-ARI/ch/2012	5318	Ж	2	НВoV

Етапи тестування: виділення ДНК НВoV1 людини з відібраної заздалегіть проби біологічного матеріалу проводили набором «Viasure RNA-DNA Extraction Kit», який є універсальним для біологічних зразків, вірусної та/чи бактеріальної природи. В основу даного етапу покладено серію відмивок за колоночним типом, даний етап унікальний тим, що не потребує додаткової кількості пластику та спеціального оснащення для проведення очищення нуклеїнових кислот.

Проводили ознайомлення з інструкцією, передоброку зразків біологічного матеріалу готування 5 реакційних сумішей:

1. «Master Mix» (протеїнкіназа K + RNA Free Water) - реакційну суміш вносили до зразка біологічного матеріалу.
2. «Karier RNA + RNA Free Water» – реакційну суміш вносили до початку відмивки нуклеїнової кислоти від біологічного сміття.
3. «Ізопропанол 99,7% + Begerer Bufer» - реакційну суміш вносили на етапі зміни колонок. Основною задачею було якісно відмити нуклеїнову кислоту від оболонки і органел клітин.
4. «Ізопропанол 99,7% + Wash Bufer I» - реакційну суміш вносили після заміни колонки.
5. «Етанол 99,8% + Wash Bufer II» - реакційну суміш вносили вкінці для осадження відмитої нуклеїнової кислоти.

На початку дослідження, на преаналітичному етапі дослідження, розморожували, реєстрували та центрифугували проби біологічного матеріалу. Далі, виконували дії відповідно до інструкції виробника.

Ампліфікацію здійснювали набором «Vocavirus Real teme detection kit».

До складу набору входили 6 стрипів по 8 пробірок в кожному та розчини з позитивним та негативним контролями ампліфікації.

В стріпи вносили по 8 мкл проби і по 5 мкл негативного та позитивного контролів, для контролю етапу ампліфікації, стріпи накривали кришками і поміщали в ампліфікатор, заздалегіть запрограмований відповідно до інструкції виробника (рис. 3.7). Валідацію результатів проводили на приладі IQ 5 («Biorad», США).

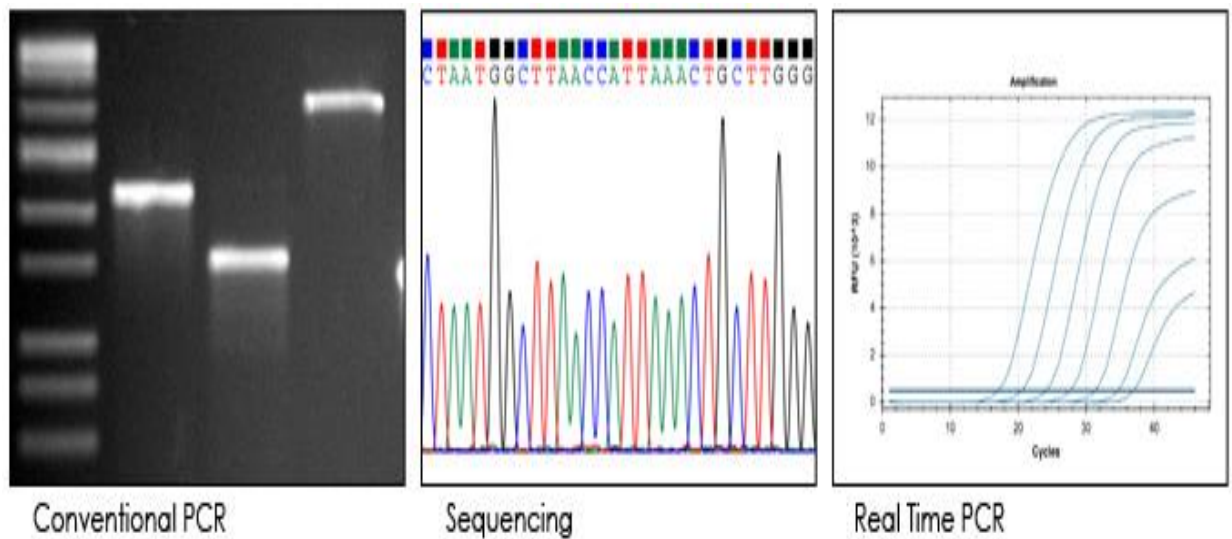


Рис. 3.7. Результати дослідження конформаційним тестом «Bocavirus Real time detection kit» («CerTest», Іспанія)

У результаті дослідження виявлено ДНК НBoV1 людини у 9 зразках біологічного матеріалу.

Завдяки конформаційному тесту, було виявлено тільки бокавірус людини 1 типу у дітей України, хворих на ГРВІ та інфекційне загострення БА та БОС.

Для більш поглибленого вивчення та характеристики генотипу НBoV нами було застосовано метод Сенгера, який виконували в референс-центрі з моніторингу за збудниками інфекцій дихальних шляхів ФБУН ЦНІЕ Росспоживнагляду.

В основу методу покладено принцип синтезу комплементарного ланцюга ДНК на основі мДНК за допомогою ДНК-полімерази (див. розділ «Матеріали та методи дослідження»).

Філогенетичне дерево будували методом поєднання найближчих сусідів із застосуванням перестановочного аналізу статистичної значимості сконструйованого дерева по 500 реплікам (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Філограма повногеномних послідовностей генотипів НВoV побудована методом максимальної подібності, у вузлах вказані статистичні індекси підтримки

Порівняння та аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей виконували із застосуванням серверу Національного центру біотехнологічної інформації «NCBI», (США), який включає в себе бази даних Gen Bank (США), EMBL (Європа) и DDBJ (Японія) за допомогою алгоритму BLAST 2.2.24.

В результаті проведеного дослідження було підтверджено циркуляцію НВoV1 на території України у дітей з ГРВІ та з інфекційним загостренням БА та БОС.

Висновки до розділу 3.

Першою задачею нашого дослідження було, встановити роль бокавірусу людини в етіологічній структурі ГРВІ у дітей України. Бокавірус людини виявляли в структурі ГРВІ у 42,3 % від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків.

Бокавірусну моно-інфекцію виявляли у 45,5 % випадків, а бокавірусну мікст-інфекцію у 54,5 % випадків. Визначали вірусно-вірусну мікст-інфекцію: «бокавірус + риновірус», «бокавірус + аденовірус», «бокавірус + риновірус + аденовірус». Встановлено, що найбільш уразливими до НВoV людини виявились діти другої групи від 1 до 3 років, збудник було виявлено у 25,0 % випадків.

Оцінювали клінічні особливості перебігу бокавірусної інфекції у дітей з ГРВІ: утруднене дихання, задишка, неспокій, висока температура тіла, сильний кашель.

Другою задачею нашого дослідження було встановити роль бокавірусу людини при інфекційному загостренні БА та БОС у дітей України.

Встановлено, що бокавірус людини є «тригером» інфекційного загострення БА та БОС, його було ідентифіковано у 53,6 % випадків в етіологічній структурі респіраторних вірусів.

Встановлено бокавірусну моно-інфекцію у 86,4 % випадків, а бокавірусну мікст-інфекцію «бокавірус + риновірус + аденовірус» та «бокавірус + РС-вірус + аденовірус» у 13,6 % випадків.

Досліджували частоту виявлення бокавірусу людини у дітей різних вікових груп, за результатами дослідження бокавірус частіше виявляли у 23,8 % у дітей вікової групи від 1 до 3 років. Хворі діти, які приймали участь в експериментальних дослідженнях частіше поступали до стаціонарів зі скаргами на: закладеність носу, ринорею, гіперемію зіву, кашель та ядуху переважно вночі. Достовірних відмінностей по частоті виявлення основних симптомів не було виявлено ($p > 0,05$).

Нами встановлено епідеміологічні особливості бокавірусної інфекції у дітей. Аналіз щомісячного виявлення бокавірусів та інших респіраторних вірусних збудників за період з 2012 по 2014 роки.

Показано, що частота виявлення НВоV коливалася в широких межах упродовж року та чітко характеризувалася двома піками: один з яких припав на вересень-жовтень, а другий на весняний період з максимальним виявленням збудника у квітні місяці.

Важливою задачею дисертаційного дослідження було вивчення молекулярно-генетичних особливостей бокавірусів людини виявлених у дітей у період з 2012 по 2014 роки в Україні.

Для характеристики типу НВоV циркулюючого серед дітей з клінічними проявами ГРВІ та інфекційного загострення БА та БОС, нами було застосовано конформаційний тест на платформі ПЛР у моноплексному форматі. У результаті експерименту всі досліджувані зразки були позитивними на НВоV1.

Тому, на підставі проведеного експерименту ми зробили висновок, що на території України в 2012-2014 роках, серед дітей віком від 3 місяців до 15 років, хворих на ГРВІ та інфекційне загострення БА і БОС було ідентифіковано тільки бокавірус людини 1 типу.

Методом секвенування за Сенгером підтверджено циркуляцію бокавірусу людини 1 типу.

За матеріалами розділу опубліковано праці:

1. Обертинская О. В. Детекция бокавирусов 1 типа у детского населения в Украине с клиническими признаками острой респираторной вирусной инфекции / О. В. Обертинська, Ю. А. Бойко (Соломко), И. В. Дзюблик // Материалы 5-й ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням : тезисы, Москва, 25 марта 2013. — С. 294.

2. Соломко Ю. О. Детекція бокавірусу 1 типу у дітей з клінічними проявами ГРВІ / Ю. О. Соломко, О. В. Обертинська, О. І. Закалюжна // Профілактична медицина. — К., 2014. — № 3–4 (23). — С. 83–84.

3. Дзюблик І. В. Детекція бокавірусу 1 типу у дітей з клінічними проявами гострої респіраторної вірусної інфекції / І. В. Дзюблик, О. В. Обертинська, Ю. О. Соломко // Міжнародний медичний журнал. — Харків, 2015. — № 2 (82). — С. 90–95.

4. Дзюблик И. В. Выявление бокавируса 1 типа у детей Украины с ОРВИ / И. В. Дзюблик, О. В. Обертинская, Ю. А. Соломко // Лабораторная диагностика. Восточная европа. — Минск, 2015. — С. 87–94.

РОЗДІЛ 4

УДОСКОНАЛЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ БОКАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ

Запорукою ефективної етіотропної терапії при ГРВІ чи при інфекційному загостренні БА та БОС є якісна лабораторна діагностика, спрямована на виявлення та ідентифікацію збудника, що є етіологічним чинником захворювання.

В країнах Європи, етіологічна діагностика НВов1 базується на комплексному застосуванні різних високотехнологічних підходів, серед яких переважають молекулярно-генетичні та серологічні методи дослідження.

Є думка, що найбільш надійним методом ідентифікації НВов1, НВов2 та НВов3 в біологічних матеріалах є ПЛР в різних її варіантах. В огляді літератури, нами наведені різні методичні підходи та варіанти ПЛР для детекції бокавірусів людини, а також мішені та тривалість дослідження.

Нашу увагу привернули набори «ГРВІ-скрин-FL» виробництва «AmpliSens» та «Anyplex II RV16 Detection (1.1.)» виробництва «Seegene» у зв'язку з їх реєстрацією в Україні та доступністю для практичних лабораторій.

Методи серологічної діагностики, спрямовані на визначення специфічних гуморальних антитіл до бокавірусів людини, а саме, ІФА та ІБ у світі має дуже обмежене застосування і були нами відхилені, як такі, що відносяться до непрями методів, а діагностичні тест-системи не зареєстровані в Україні.

Достовірних даних щодо застосування класичних вірусологічних методів виділення й ідентифікації бокавірусів людини, методу флюорисціюючих антитіл чи експрес-тестів немає.

Нерозв'язаним залишалось питання систематизації та оптимізації спільного використання, різних діагностичних підходів, здатних підвищити інформативність обстеження пацієнта та визначати одночасно збудників бактеріальної та вірусної природи.

Тому одним із основних завдань лабораторної діагностики бокавірусної інфекції при захворюваннях органів дихання є створення алгоритму лабораторної діагностики, який би регламентував перелік та послідовність виконання методів дослідження.

При будь-якому вибраному алгоритмі етіологічної діагностики ГРВІ або тільки бокавірусної інфекції інфекцій є якість досліджуваного матеріалу. Саме тому, завдання щодо розробки та наукового обґрунтування алгоритму та оптимізації преаналітичного етапу дослідження при лабораторній діагностиці бокавірусної інфекції представлені в даному розділі.

4.1. Алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей

Ми поставили перед собою завдання: розробити та науково обґрунтувати алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей на основі застосування сучасних молекулярно-генетичних технологій ідентифікації вірусних та бактеріальних збудників.

Для виявлення бокавірусів та інших респіраторних збудників методом ПЛР проводився відбір біоматеріалу у вигляді мазка з порожнини носу. Зберігання та транспортування зразків здійснювали відповідно до вимог методичних рекомендацій [198].

Виділення та ідентифікацію бокавірусів людини та інших респіраторних вірусів здійснювали, як описанов розділі 2 «Матеріали та методи дослідження».

Наявність атипичних збудників *Mycoplasma pneumoniae* та *Chlamydia pneumoniae* у біологічному матеріалі визначали за допомогою ПЛР у реальному часі. Для досягнення цієї мети застосовували набір реагентів для ПЛР у мультиплексному форматі з гібридизаційно-флюоресцентною детекцією «АмпліСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydia pneumoniae*-FL» (див. розділ 2 «Матеріали і методи»).

Для індикації основних респіраторних вірусів, також використовували швидкі ІХА-тести «Cito Test Influenza A&B», «Cito Test ADENORESPI» та «Cito Test RSV Blister» виробництва «Фармаско», (Україна) [199].

Діагностику вірусів грипу А та В здійснювали експрес-тестами «Cito Test Influenza A&B» виробництва «Фармаско», (Україна).

Матеріал для дослідження мазок із носу. Пробопідготовку та нанесення зразків на експрес-тест здійснювали відповідно до інструкції виробника і так, як представлено на рис. 4.1.

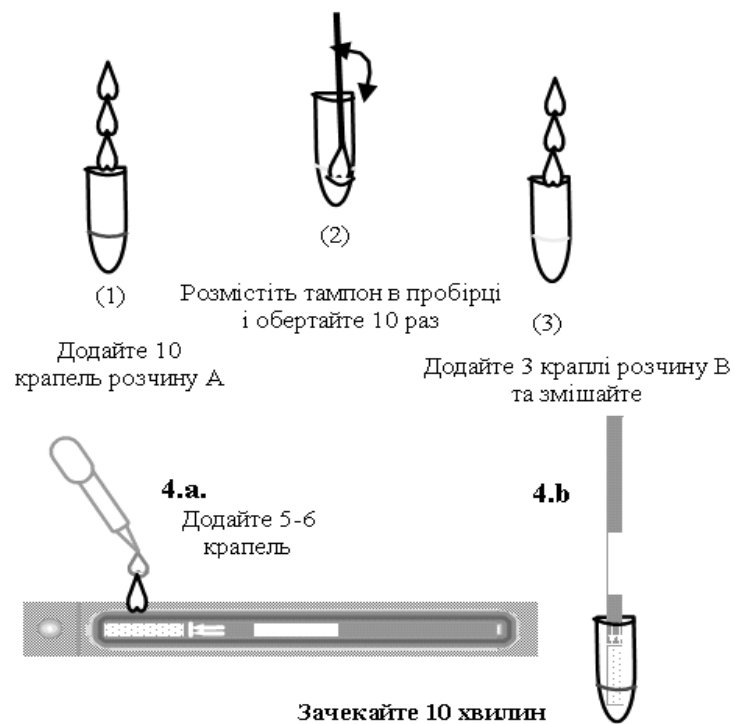


Рис. 4.1. Порядок проведення пробопідготовки для дослідження мазків із носу на грип А + В [199]

Інтерпретацію результатів здійснювали через 10 хвилин. Позитивним на грип А вважали тест, якщо через 10 хвилин з'являлася зелена контрольна лінія «С» і червона лінія в зоні «Т» у віконці результату. Позитивним на грип В вважали тест, якщо через 10 хвилин у віконці результату з'являлася зелена контрольна лінія «С»

і блакитна лінія в зоні «Т» (рис. 4.2).

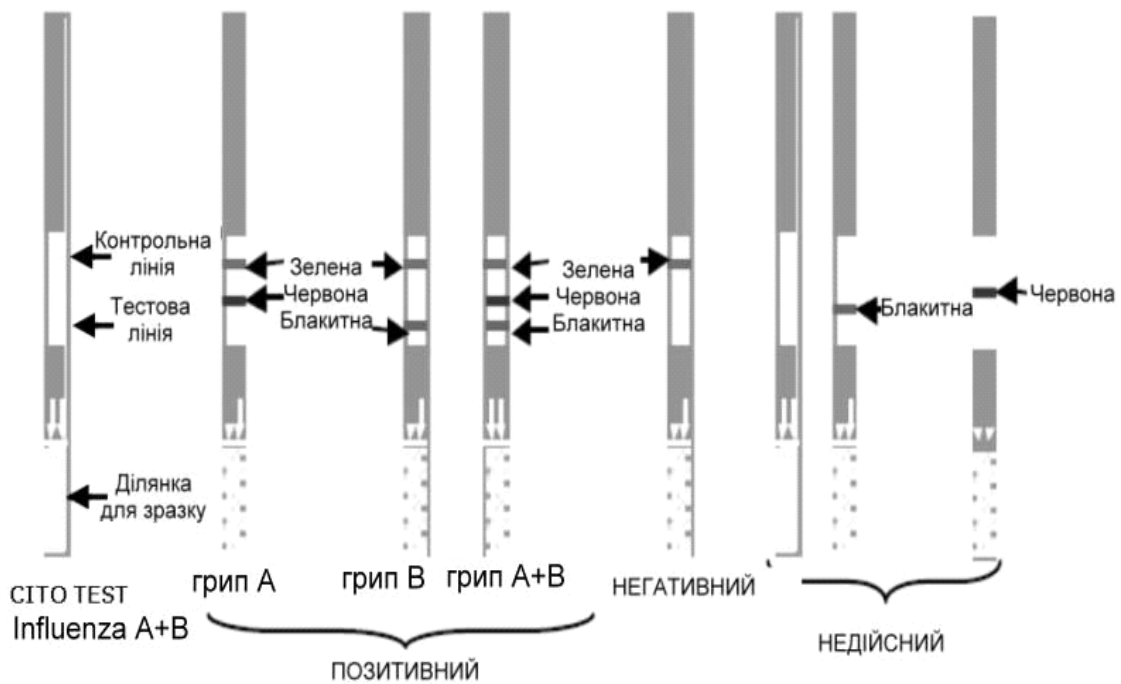


Рис. 4.2. Інтерпретація результату дослідження на грип А + В при застосуванні швидкого тесту «Cito Test Influenza A&B», виробництва «Фармаско», (Україна)

[199]

Тест вважався негативним, якщо з'являлася зелена контрольна лінія «С». Сумнівним тест вважався при відсутності зеленої лінії «С» у віконці результату.

Для виявлення антигенів респіраторних аденовірусів, застосовували ІХА-тест «Cito Test ADENORESPI» компанії «Фармаско» (Україна). Порядок проведення дослідження представлено на рис. 4.3.

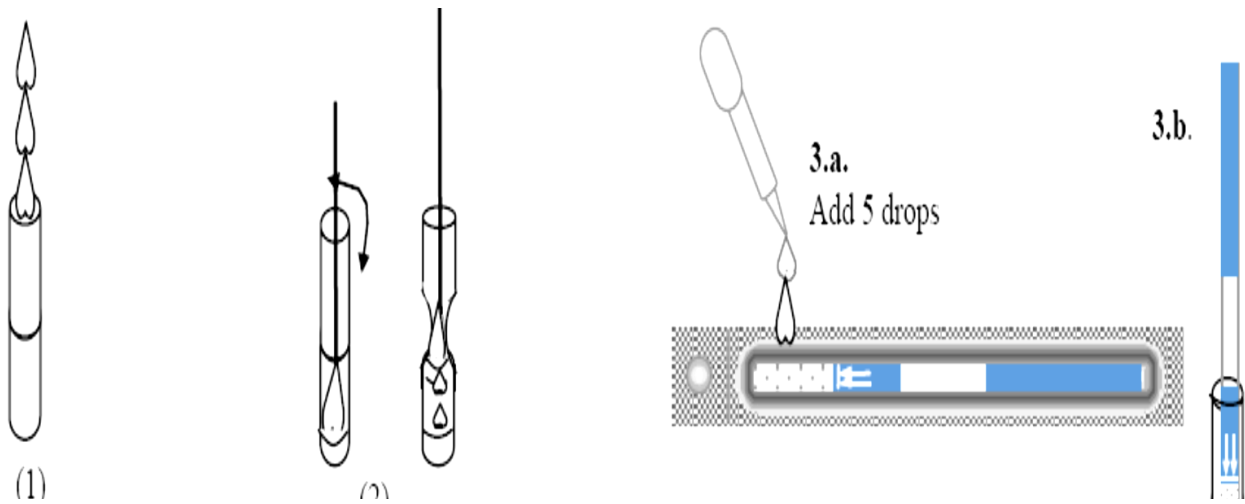


Рис. 4.3. Порядок дослідження мазків з носу ІХА-тестом «Cito Test ADENO RESPI» виробництва компанії «Фармаско», (Україна) [199]

Облік результатів проводили через 10 хвилин. Негативним вважали результат, при появі зеленої лінії у контрольній ділянці тесту. Позитивним вважали результат, коли в доповнення до зеленої контрольної лінії, з'являлася блакитна тестова смуга на мембрані тесту. Недійсним вважали результат, коли у віконці контролю не з'являлась зелена контрольна лінія (рис. 4.4).

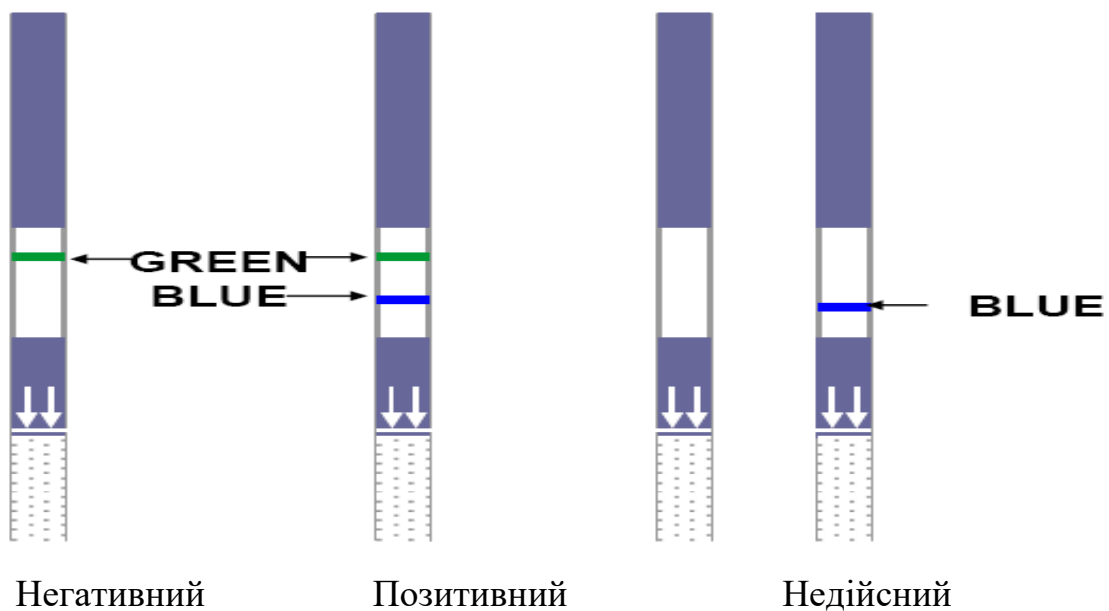


Рис. 4.4. Інтерпретація результатів дослідження ІХА-тестом «Cito Test ADENO RESPI» виробництва компанії «Фармаско», (Україна) [199]

Швидкий ІХА-тест «Cito Test RSV Blister» використовували для діагностики РС-інфекції А/В та диференційної діагностики з іншими респіраторними вірусами. Матеріалом для дослідження слугували мазок з носу або носоглоткові змиви. Процедура тестування на РС-віруси включала в себе такі ж самі етапи, як і при дослідженні на грип. Результат тестування обліковували візуально через 10–15 хвилин після нанесення зразка.

Вперше в Україні для виявлення бактеріальних збудників нами застосовані експрес-тести «Alere BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*» і «Alere BinaxNOW *Legionella pneumophila*», виробництва «Alere» (Іспанія) [200, 201] (*Примітка – набори для виявлення *Legionella pneumophila* та *Streptococcus pneumoniae* було ввезено до України одноразово для експериментальних досліджень).

Набір «Alere BinaxNOW *Legionella pneumophila*» – це експрес-тест, який дозволяє виявляти антигени до *L. pneumophila* серогрупи 1 на ранній стадії захворювання.

Матеріалом для дослідження слугували зразки сечі. Відбір сечі здійснювали у стандартні контейнери, що додаються до набору.

Зразки та тест-набори витримували при кімнатній температурі. Перед тестуванням діставали тест карту із герметичного пластику. Стерильний тампон занурювали робочою поверхнею у зразок сечі, маніпуляції здійснювали відповідно інструкції виробника.

Для видалення надлишку рідини, тампон притискали до бокової стінки контейнера. Далі поміщали тампон у спеціальний отвір на тест-картці, додавали 3 краплі буферного розчину А, обережно знімали захисну плівку з правої сторони тест-карти. Герметично закривали тест-карту і через 15 хвилин оцінювали результати.

Тест вважали негативним, якщо у контрольному віконці зверху з'являлася одна лінія рожевого кольору. Позитивним вважали зразок, якщо у контрольному віконці з'являлися дві рожеві лінії. Якщо лінії взагалі не проявлялися, то тест вважали недійсним (рис. 4.5).

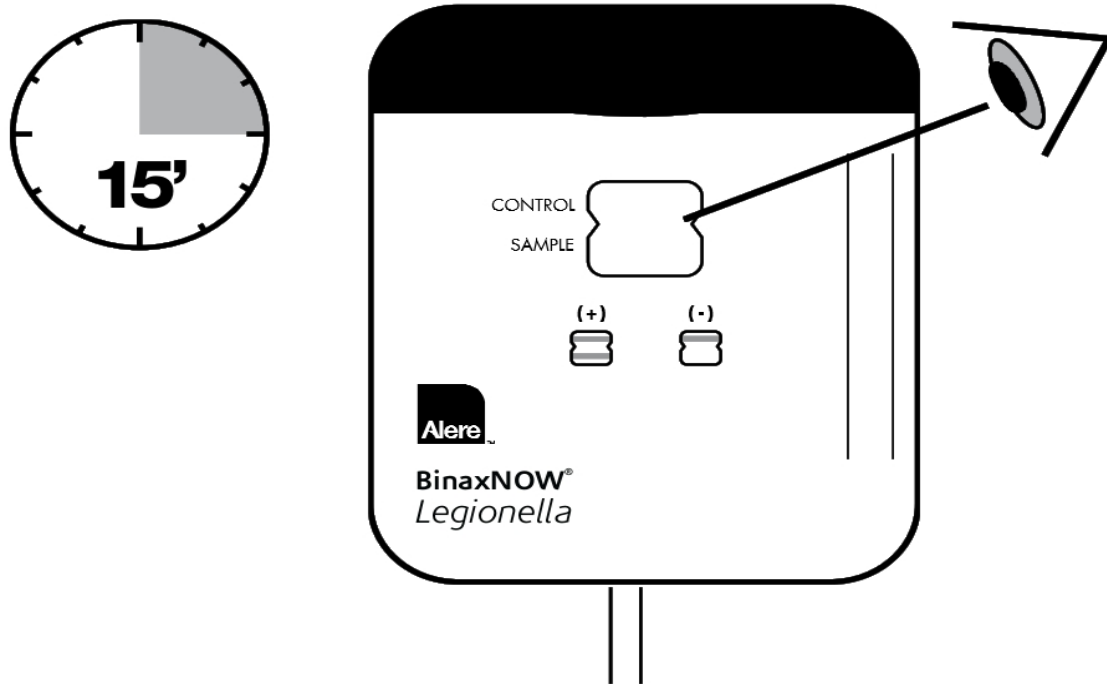


Рис. 4.5. Інтерпретація результату дослідження на *L. pneumophila*, застосовували набір «Alere BinaxNOW *Legionella pneumophila*» виробництва «Alere» (Іспанія) [200]

Для виявлення антигенів до *S. pneumoniae* в сечі хворого із загостренням БА та БОС застосовували набір «Alere BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*».

Сечу відбирали у стандартні контейнери. Зразки і тест-набір витримували при кімнатній температурі декілька хвилин. Стерильний тампон із набору занурювали робочою поверхнею у зразок сечі.

Для видалення надлишку рідини, тампон притискали до бокової стінки контейнера і поміщали у спеціальний отвір на тест-картці. Додавали 3 краплі буферного розчину А і обережно знімали захисну плівку з правої сторони тест-карти. Герметично закривали тест-карту. Через 15 хвилин обліковували результати тестування.

Тест вважали негативним, якщо у контрольному віконці зверху з'являлася одна лінія рожевого кольору. Позитивним вважався зразок, якщо у контрольному віконці з'являлися дві рожеві лінії. Якщо лінії взагалі не проявилися, то тест вважався недійсним (рис. 4.6).

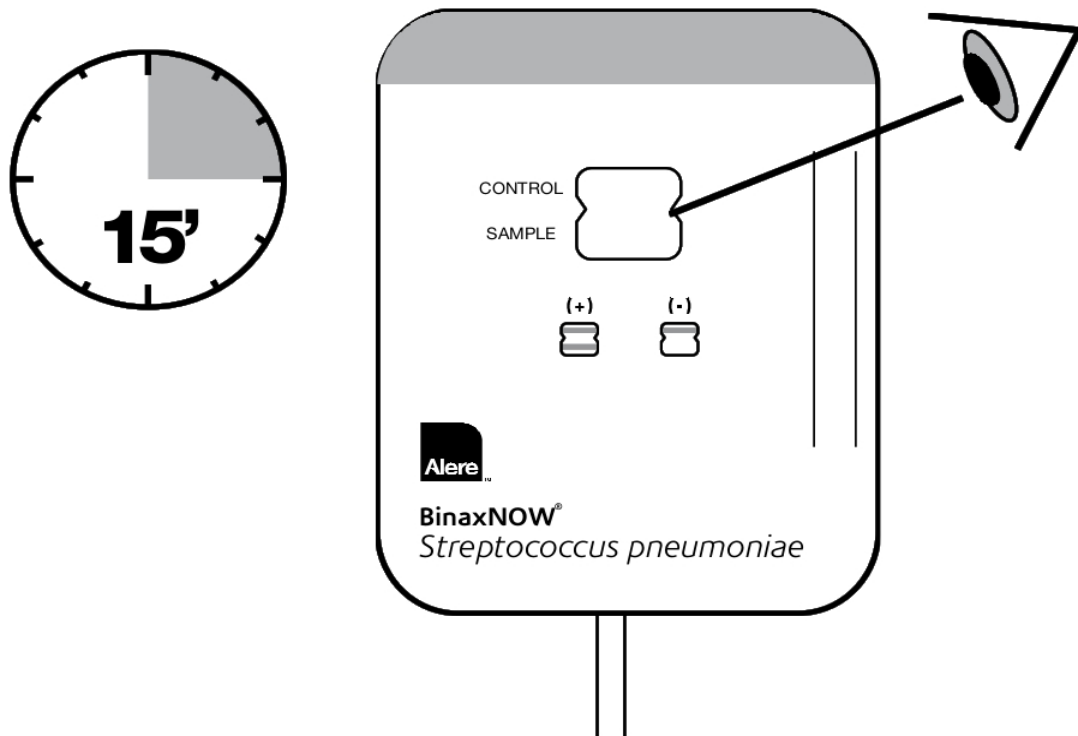


Рис. 4.6. Інтерпретація результату дослідження на *S. pneumoniae*, застосовували набір «Alere BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae*» виробництва «Alere» (Іспанія) [201]

Дослідження експрес-тестами у дітей на наявність респіраторних вірусів показало наступне: виявлено антигени до вірусу грипу А у 9 осіб ($12,2 \pm 9,6$ %), респіраторних аденовірусів – у 6 осіб ($8,1 \pm 5,8$ %) та РС-вірусів А і В – у 7 осіб ($9,5 \pm 6,2$ %).

Антигени до вірусу грипу В не було виявлено в жодному випадку експерименту.

Загальна ефективність діагностики експрес-тестами в цілому у 74 осіб склала ($29,8 \pm 9,7$ %).

Результати експрес-тестів на наявність у сечі антигенів атипичних бактеріальних збудників виявилися негативними в усіх випадках. Загальна ефективність діагностики швидкими тестами на атипичні бактеріальні збудники в цілому у 74 осіб склала 0 % випадків.

Дані, отримані експрес-тестами, повністю відповідали даним молекулярно-генетичних досліджень методом ПЛР у мультиплексному форматі на наявність бактеріальних збудників *Mycoplasma pneumoniae* та *Chlamydia pneumoniae*. За результатами дослідження в жодному випадку атипові збудники виявлені не були.

Оцінювали ефективність етіологічної діагностики респіраторних вірусних збудників методом ПЛР у мультиплексному форматі.

Для перевірки ефективності алгоритму лабораторної діагностики досліджували 78 мазків із порожнини носу. Частота виявлення респіраторних вірусних збудників в т.ч. НВoV1 людини в етіологічній структурі ГРВІ відображена на рис. 4.7.

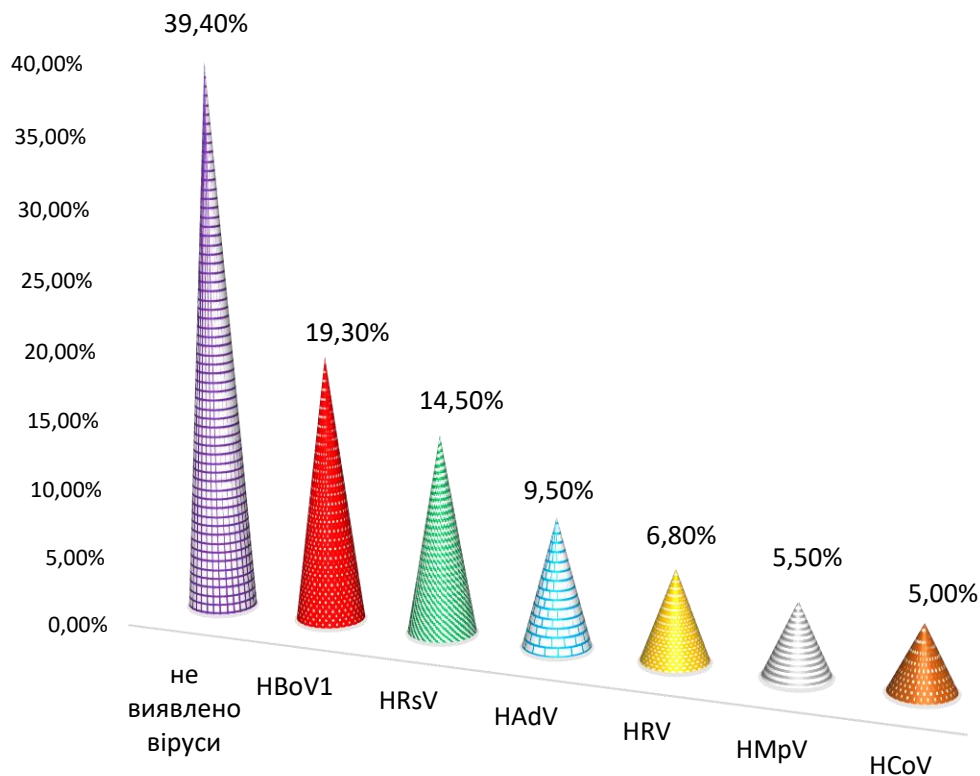


Рис. 4.7. Частота виявлення НВoV1 людини в етіологічній структурі ГРВІ

За результатами дослідження виявлено вірусні збудники у 77,3% випадків, збудники не виявлено у 22,7%. З них, НВoV1 людини виявлено у 33,3%, HRsV – 14,5%, HAdV – 11,2%, HCoV – 6,8%, HMPV – 6,5%, а HRV у 4,8% випадків.

Таким чином, ефективність етіологічної діагностики методом ПЛР у мультиплексному форматі на 16 збудників склала 90,3 %, що в 3,3 рази вище ніж при застосуванні тільки швидких тестів ($p < 0,05$).

Важливо підкреслити, що застосування ПЛР у мультиплексному форматі дозволило, крім бокавірусів, ще одночасно виявити добре відомі основні збудники захворювань органів дихання та ідентифікувати «нові» віруси, які не виявляються іншими, в тому числі серологічними та класичними вірусологічними методами.

В результаті проведеного дослідження нами був побудований алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції (рис. 4.8).

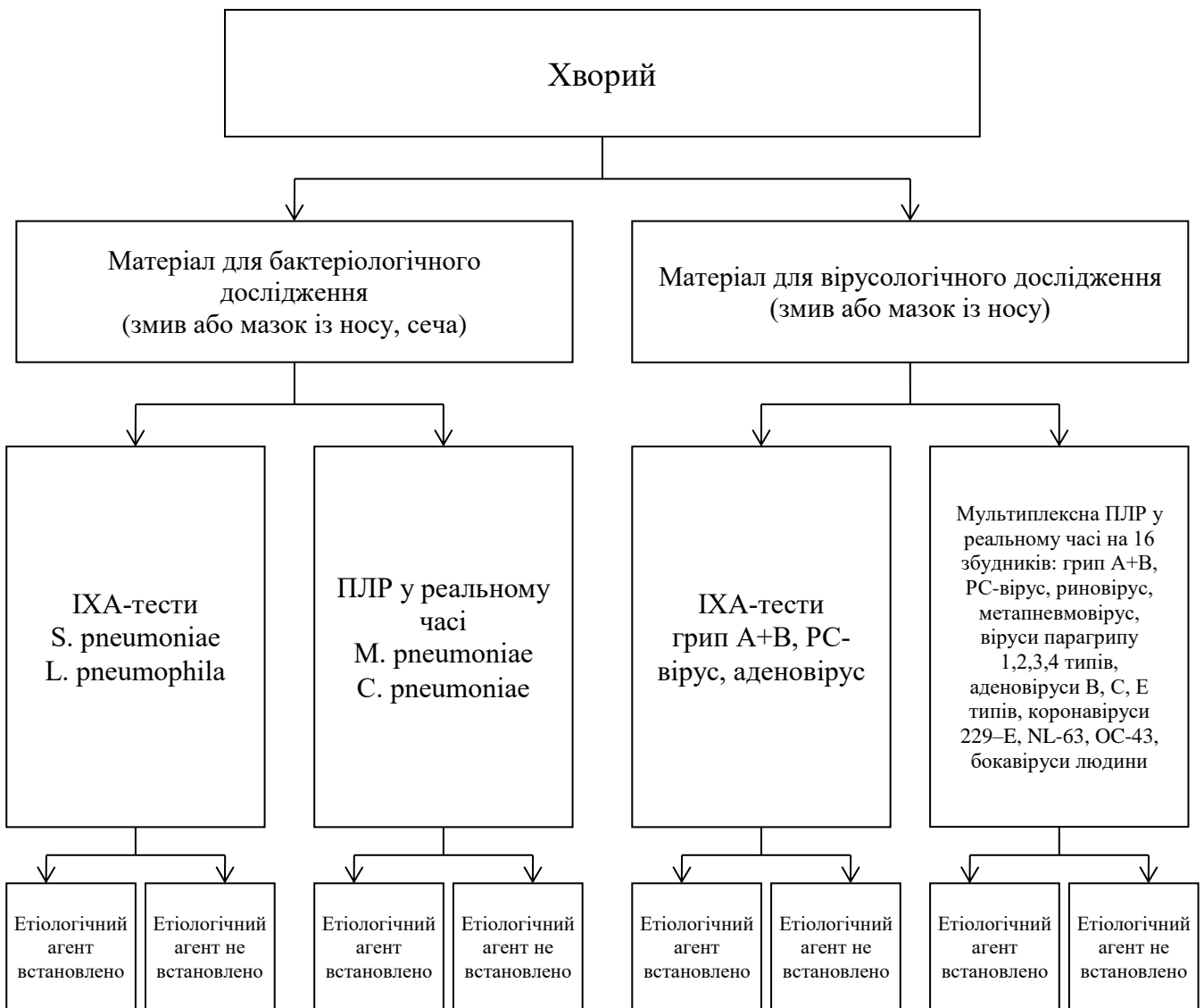


Рис. 4.8. Алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції

Алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції включав наступні кроки.

Крок 1. Біологічний матеріал від хворого бажано отримати до початку курсу етіотропної терапії в перші дві доби після звернення хворого до стаціонару.

Крок 2. Тестування з використанням експрес-тестів можна проводити біля ліжка хворого, в приймальному відділенні, в маніпуляційному кабінеті або в умовах лабораторії. Застосування сучасних швидких тестів для індикації бактеріальних та вірусних агентів дозволяє отримати результат в дуже короткий термін – за 10-15 хвилин та своєчасно розпочати етіотропну терапію.

Крок 3. Для ПЛР дослідження, біологічний матеріал (мазок із носу) відбирають окремо сухими стерильними велюр-тампонами та поміщають в пробірки з транспортним середовищем, що надається фірмою-виробником тест-системи для безпечного і якісного зберігання. Транспортування зразків до молекулярно-генетичної лабораторії відбувається з дотриманням холодового ланцюга в день відбору біоматеріалу.

Крок 4. Для діагностики бокавірусної інфекції доцільно застосовувати ПЛР у мультиплексному форматі для одночасного визначення не тільки бокавірусу, але й інших респіраторних вірусів з метою виявлення можливого мікст-інфікування бокавірусів з риновірусами, з аденовірусами тощо.

Крок 5. Для виявлення бактеріальних атипичних збудників доцільно застосовувати ПЛР в реальному часі в форматі на один, або на 2-3 збудника.

Молекулярно-генетичні дослідження на основі ПЛР, сьогодні – основний метод, який дозволяє ідентифікувати бокавіруси людини.

Наявні в Україні молекулярно-генетичні лабораторії різної підпорядкованості здатні забезпечити етіологічну діагностику бокавірусної інфекції, тому розробка ефективного алгоритму діагностики є своєчасною на сьогодні.

Запропонований алгоритм забезпечує реалізацію двох різних методичних підходів – індикацію антигенів респіраторних вірусних і бактеріальних агентів та детекцію геномної ДНК/РНК збудників. За першого підходу застосовуються

сучасні високочутливі та високо специфічні швидкі тести. За другого підходу – молекулярно-генетичні методи. Включення до алгоритму діагностики бокавірусної інфекції високотехнологічної мультиплексної ПЛР у комплексі з експрес-тестами дозволяє не тільки ідентифікувати бокавірус людини, але й виявити випадки мікст-інфекції з іншими збудниками вірусної або бактеріальної природи.

Запропонований алгоритм дозволяє встановити наявність бокавірусної інфекції при інфекційному загостренні БА та БОС і значно підвищити ефективність етіологічної діагностики у дітей до 90,3 %. Алгоритм може бути рекомендований до широкого застосування в практиці охорони здоров'я.

4.2. Науково-методичне обґрунтування вибору тампонів для відбору біологічного матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції

Для виявлення респіраторних збудників методом ПЛР зазвичай досліджують зразки біологічного матеріалу, такі як: мазки та змиви з порожнини носу, мазки та змиви з ротоглотки, харкотиння, секційний матеріал тощо.

У нашій роботі ми досліджували біологічний матеріал відібраний із порожнини носу у хворих на ГРВІ дітей.

Відбір біологічного матеріалу здійснювали в період активної екскреції вірусу, стерильними одноразовими тампонами в стерильні одноразові пробірки зі спеціальним транспортним середовищем у повній відповідності до нормативних документів. У методичних рекомендаціях [191] зазначено регламентований перелік біологічного матеріалу, який доцільно використовувати для вирішення певних діагностичних задач, а також висвітлені загальні вимоги до відбору, зберіганню і транспортуванню біоматеріалу для лабораторного дослідження.

В рекомендаціях зазначено, що відповідальність за правильне маркування, оформлення супровідного направлення (первинного направлення), відбір та якість біоматеріалу, несуть медичні працівники лікувального закладу, які проводили медичний огляд та відбирали матеріал. Проте, ці методичні рекомендації не

регламентують адсорбційні властивості тампонів для відбору зразків для етіологічної діагностики респіраторних вірусних інфекцій у дітей і дорослих.

Для визначення адсорбуючих властивостей тампонів, досліджували три види інструментів: велюр-тампони «FLOQS wabs» («COPAN», Італія); тампони із віскози «JS» («Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd», Китай) та урогенітальні цитощітки «ЗГУ-ЦМ» («Центрмед», Росія).

Експериментальні дослідження проводили у двох груп пацієнтів. До першої групи (група №1) увійшли 56 дітей віком від 3 місяців до 3 років, а до другої групи (група №2) 56 дітей віком від 3 до 15 років.

У групі №1 відбирали мазки з обох носових порожнин різними інструментами: з лівої ніздрі - велюр-тампонами «FLOQ Swabs» (56 зразків), а з правої ніздрі - тампонами із віскози «JS» (56 мазків). Всього відібрано та проаналізовано 112 зразків біологічного матеріалу.

В групі №2 відбирали мазки двома інструментами: з лівої ніздрі - урогенітальними цитощітками «ЗГУ-ЦМ» (56 зразків), а з лівої – тампонами із віскози «JS» (56 зразків). У групі №2 всього відібрано та проаналізовано 112 зразків.

У сумі, загальна кількість досліджених зразків біологічного матеріалу склала 224 проби.

Експериментальне дослідження адсорбуючих властивостей тампонів для відбору біологічного матеріалу складалося з декількох етапів:

- санація носової порожнини для видалення слизу та пилу з носових ходів;
- відбір мазків інструментів з лівого і правого носових ходів, техніка відбору зображена на рис. 4.9.

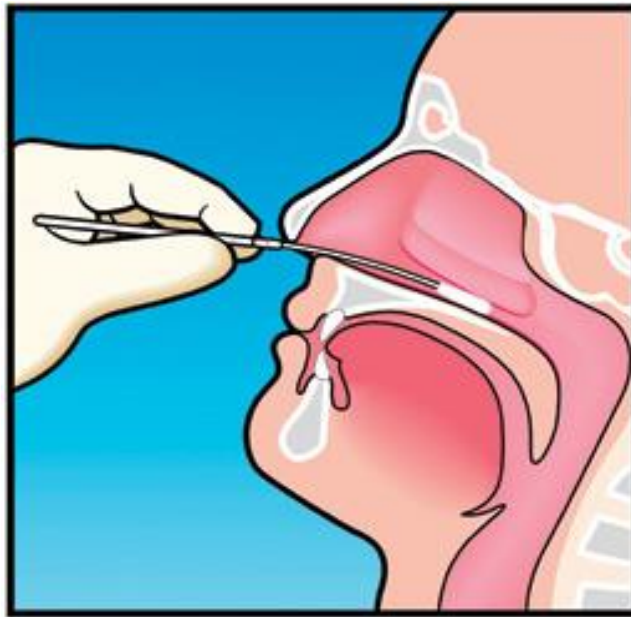


Рис. 4.9. Техніка забору мазка з порожнини носу

- занурення інструментів у спеціальне транспортне середовище, для велюр-тампонів використовували 1мл «UTM for the Collection and Preservation of Virus, Clamidia, Mycoplasma, Ureaplasma» («Copan Diagnostics», Італія), а для урогенітальних цитоціток і тампонів із віскозного волокна - 1мл «Транспортного середовища для зберігання респіраторних мазків» («AmpliSens», Росія);

- оцінка адсорбуючих властивостей інструментів (тампонів і цитоціток) підрахунком клітин у гемоцитометрі;

- оцінка накопичувальних властивостей транспортного середовища методом ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 респіраторних вірусних збудників.

Біоматеріал відбирали стерильними інструментами, далі занурювали його у пробірки з транспортним середовищем, промарковували (вносили дату відбору і ідентифікаційний номер, присвоєний хворому під час дослідження з урахуванням ніздрі – правої чи лівої), ставили до штативів і транспортували (враховуючи умови зберігання) до ПЛР- лабораторії кафедри вірусології НМАПО імені П. Л. Шупика.

В ПЛР-лабораторії проводили попередню передобробку біологічного матеріалу, а саме:

1. реєстрували зразки (інформацію вносили до спеціально розроблених форм);
2. звільняли тампони від відібраних клітин в транспортне середовище шляхом струшування (мікроцентрифуги «Вортекс») та осаджували краплі з кришок (мікроцентрифуга «MicroSpin»);
3. відбирали необхідну для ПЛР-дослідження кількість пробірок типу «Ependorf», маркували відповідно до списку і вносили по 100 мкл проби;
4. готові проби досліджували методом ПЛР на наявність респіраторних вірусів.

Для оцінки адсорбуючих властивостей інструментів для відбору біологічного матеріалу, готували робочий ізотонічний розчин барвника для підрахунку клітин у гемоцитометрі. У скляній пробірці змішували 4,25 % розчину NaCl і 0,2 % профітрольного розчину мортального барвника трипанового синього 0,2 % у дистильованій воді у співвідношенні 1:4. Далі, відбирали необхідну кількість стерильних пробірок типу «Епендорф» і вносили в них по 200 мкл проби біологічного матеріалу та по 800 мкл приготованого робочого ізотонічного розчину барвника. Пробірки зі сумішшю струшували та осаджували краплі з кришок за допомогою мікроцентрифуги «Вортекс», далі по 45 мкл вносили на скельця і досліджували за допомогою гемоцитометру. Здорові клітини підраховували у 25 квадратах гемоцитометру під світловим мікроскопом, як описано у навчально-методичному посібнику «Культура клітин у медичній вірусології» [202]. Результати досліджень вносили до списку.

Отже за результат підрахунку клітин у групи пацієнтів №1 у гемоцитометрі показав, що найбільше клітин було відібрано велюр-тампонами 560,000 клітин в 1 мл (табл. 4.1), а тампонами із віскози було відібрано 140,000 клітин в 1 мл (табл. 4.2).

Таблиця 4.1

Результати підрахунку клітин у гемоцитометрі для велюр-тампону

Кількість клітин	Кількість квадратів				
	2	2	1	4	2
	2	0	1	3	1
	3	1	3	2	0
	1	5	3	3	2
	1	1	1	1	0
Всього	13	14	12	12	5
Загальна кількість клітин в 1 мл			n=	560,000	

Таблиця 4.2

Результати підрахунку клітин в гемоцитометрі для тампонів із віскози

Кількість клітин	Кількість квадратів				
	0	1	1	2	0
	2	1	0	0	1
	0	0	2	0	0
	0	1	0	0	0
	1	0	0	1	1
Всього	3	3	3	3	2
Загальна кількість клітин в 1 мл			n=	140,000	

На другому етапі експериментального дослідження у №1 групи пацієнтів проведено дослідження методом ПЛР для виявлення адсорбуючих властивостей інструментів для відбору та ефективності транспортного середовища.

За результатами ПЛР дослідження, респіраторні віруси у зразках відібраних велюр-тампонами виявили в 71,4 % (рис. 4.10 (а)), а у зразках відібраних тампонами із віскози в 44,6% (рис. 4.10. (b)).

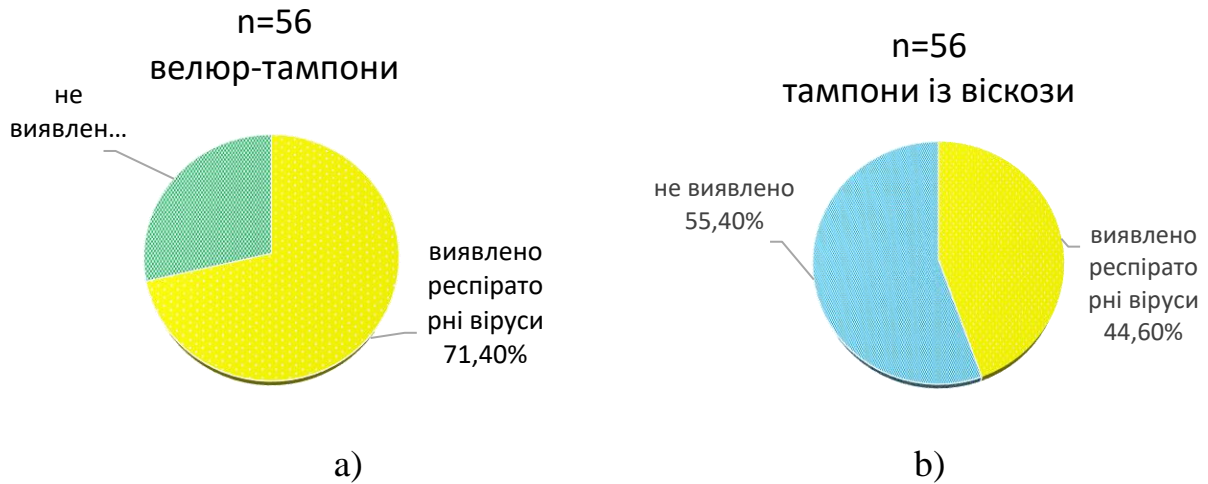


Рис. 4.10. Виявлення респіраторних вірусних збудників з мазків відібраних велюр-тампонами (а) і тампонами із віскози (б)

Проаналізовано зразки біологічного матеріалу відібрані велюр-тампонами, в результаті виявлено: НBoV1 у 42,5 % випадків, HAdV – 25,0 %, а HRV і HRsV по 12,5 % відповідно, HPiV – 7,5 % випадків (рис. 4.11. (а)).

У зразках біоматеріалу відібраних тампонами із віскози, ідентифіковано респіраторні віруси: НBoV1 у 32,0 %, HAdV – 24,0 %, HPiV -20,0 %, HRsV – 16,0 %, HRV - 8,0 % випадків (рис. 4.11. (б))

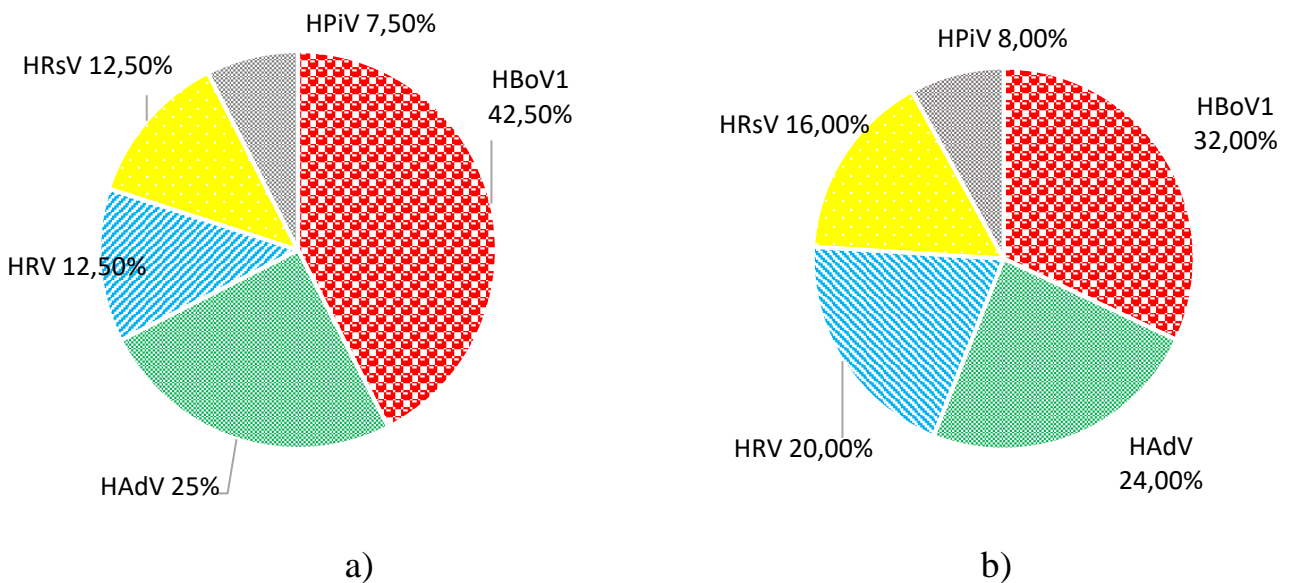


Рис. 4.11. Етіологічна структура ГРВІ у зразках біологічного матеріалу відібраних велюр-тампонами (а) і тампонами із віскози (б)

Для групи пацієнтів №2 було проведено аналогічне дослідження. Так після підрахунку клітин у гемоцитометрі встановлено, що найбільшу кількість клітин відбирають урогенітальні цитоцітки 380, 000 в 1 мл (табл. 4.3), ніж тампони із віскозного волокна – 170, 000 в 1 мл (табл. 4.4).

Таблиця 4.3

**Результати підрахунку клітин у гемоцитометрі
для урогенітальних цитоціток**

Кількість клітин	Кількість квадратів				
	2	1	1	2	3
	1	3	2	1	0
	0	4	1	2	0
	3	3	1	0	2
	0	4	0	2	0
Всього	6	15	5	7	5
Загальна кількість клітин в 1 мл			n=	380,000	

Таблиця 4.4

**Результати підрахунку клітин у гемоцитометрі
для тампонів із віскози**

Кількість клітин	Кількість квадратів				
	2	1	2	2	2
	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	1	2	0	0	0
	0	2	1	1	0
Всього	4	5	3	3	2
Загальна кількість клітин в 1 мл			n=	170,000	

Проведені дослідження методом ПЛР у групи №2 показали, що найбільше вірусних збудників виявлено урогенітальними цитоцітками в 55,4 %, порівняно з тампонами із віскози в 44,6, 0% випадків (рис. 4.12 (a) та (b)).

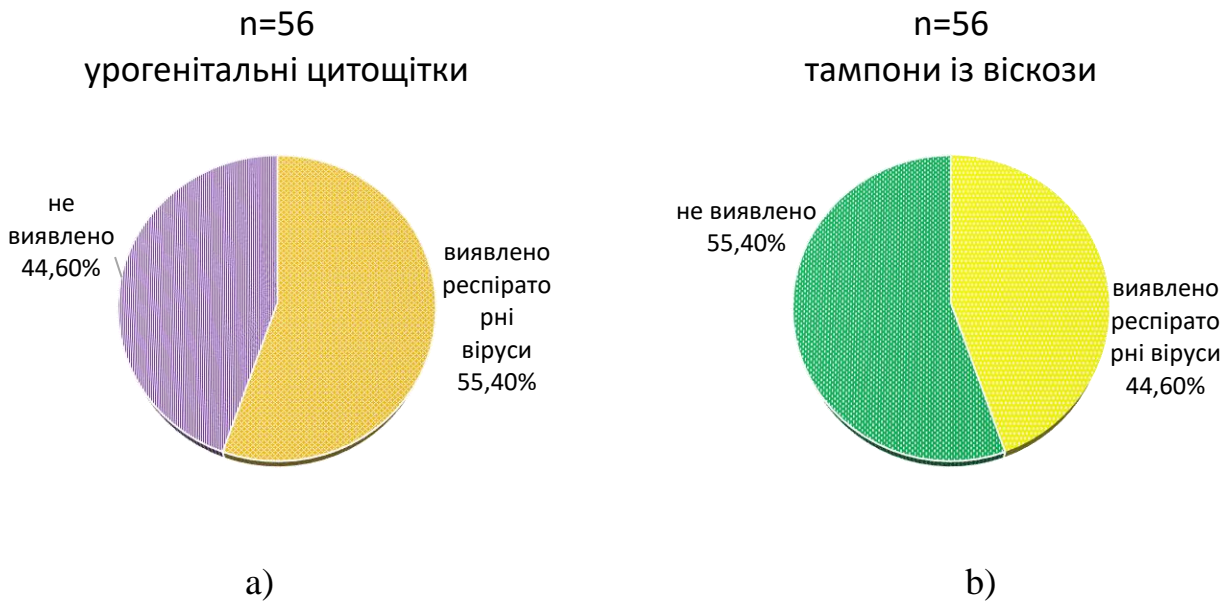


Рис. 4.12. Виявлення респіраторних вірусних збудників

з мазків відібраних урогенітальними цитоцітками (a) і тампонами із віскози (b)

За результатами молекулярно-генетичних досліджень, а саме, ПЛР у мультиплексному форматі, було ідентифіковано респіраторні вірусні збудники у матеріалі відібраному урогенітальними цитоцітками, з них: HBoV1 – 32,2 %, HAdV – 25,8 %, HRV – 19,4 %, HPiV – 12,9 %, HCoV – 9,7 %.

У зразках відібраних тампонами із віскози виявлено вірусні збудники: HBoV1 – 36,0 %, HAdV – 28,0 %, HRV – 16,0 %, HPiV – 12,0 %, HCoV – 8,0 (рис. 4.13. (a) та (b)).

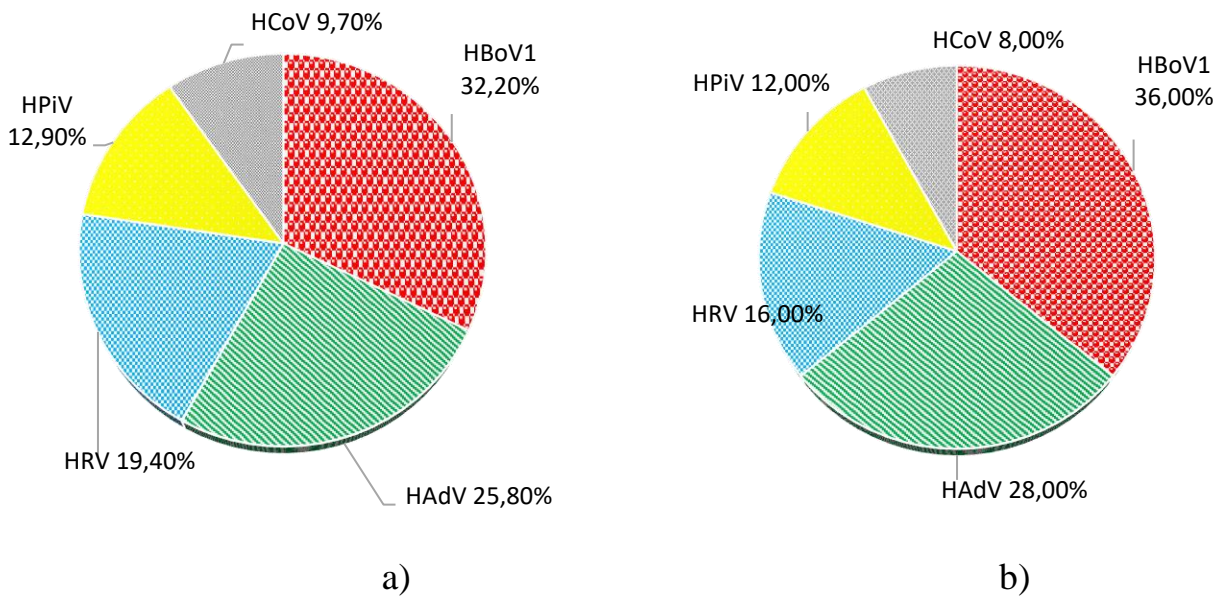


Рис. 4.11. Етіологічна структура ГРВІ у зразках відібраних урогенітальними цитоцітками (а) та тампонами із віскози (б), дані наведені у відсотках від загальної кількості лабораторно підтверджених випадків

Для визначення адсорбуючих властивостей інструментів для відбору біоматеріалу, нами проведено їх порівняльну характеристику (табл. 4.5).

За результатами експерименту, встановлено, що у групі пацієнтів №1, найбільш ефективні велюр-тампони (560,000 кліт. в 1 мл), а у групі №2 – урогенітальні цитоцітки (380,000 кліт. в 1 мл), проте, не менш ефективними виявилися тампони із віскозного волокна (у групі №1 ними було відібрано 140,000 кліт. в 1 мл, а у групі №2 – 170,000 кліт. в 1 мл).

В ході експерименту обчислювали усі результати дослідження, їх показники вносили до таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Порівняння адсорбуючих властивостей інструментів: велюр-тампонів, тампонів із віскози та урогенітальних цитощіток для відбору біологічного матеріалу

Показники	Група пацієнтів №1		Група пацієнтів №2	
	Велюр-тампони n=40*	Тампони із віскози n=25*	Урогенітальні цитощітки n=31*	Тампони із віскози n=25*
Бокавірус (HBoV)	42,5±7,4	32,0±7,7	32,2±8,4	36,0±9,6
Аденовірус (HAdV)	25,0±9,1	24,0±8,8	25,8±7,8	28,0±8,9
Риновірус (HRV)	12,5±9,8	20,0±9,2	19,4±7,1	16,0±7,3
РС-вірус (HRsV)	12,5±9,8	16,0±9,5	-	-
Віруси парагрипу (HPiV)	7,5±9,9	8,0±9,9	12,9±6,0	12,0±6,5
Коронавірус (HCoV)	-	-	9,7±5,3	8,0±5,4

*Примітка – загальна кількість зразків позитивних методом ПЛР на респіраторні віруси

На підставі аналізу інструментів для відбору біологічного матеріалу, було з'ясовано, що для групи пацієнтів №1 найбільш ефективними виявилися велюр тампони (71,4±7,1) %, ніж тампони із віскози (44,6±9,9) %. У пацієнтів №2 групи ефективнішими виявилися урогенітальні цитощітки (55,4±8,9) %, порівняно з тампонами із віскози (44,6±9,9) % ($p \leq 0,01$).

Аналізуючи отримані результати ми враховували досвід зарубіжних колег, які вже проводили подібне дослідження.

Так, Чен Кхан та колеги з Китаю в своїх дослідженнях відбирали мазки із порожнини носу тампонами із віскози, а мазки із ротоглотки та назальні змиви – велюр-тампонами. Виявлення респіраторних вірусів здійснювали методом ПЛР. У результаті проведеного дослідження встановлено, що велюр-тампони мали набагато більшу адсорбуючу спроможність порівняно з тампонами із віскози [203].

Проте, питання адсорбуючих властивостей та ефективності відбору біоматеріалу у дітей, особливо у немовлят, на часі, дуже актуальне. Тому, однією з наших задач було дослідити та дати науково-методичне обґрунтування вибору тампонів для відбору біологічного матеріалу, які були б ефективними як для дітей раннього віку так і для дорослих.

За результатами дослідження інструментів для відбору біологічного матеріалу, а саме, велюр-тампонів, тампонів із віскози та урогенітальних цитощіток, було встановлено, що для дітей віком від 3 місяців до 3 років найбільш ефективними є велюр-тампони.

Оцінюючи характеристики інструментів та транспортного середовища, слід відмітити, що велюр-тампони від компанії «Соран» були дуже зручні у використанні, так як в набір входили, власне тампон і транспортне середовище. Також важливо зазначити, що велюр-тампон мав досить гнучкий стрижень з надсічкою для надлому це було дуже важливим для занурення його в пробірку з транспортним середовищем. При застосуванні тампону в групі пацієнтів №1 до якої увійшли діти віком від 3 місяців до 3 років, важливо підкреслити, що попередню санацію носової порожнини у немовлят міг травмувати носові ходи дітей, тому відбір біоматеріалу проводити без попередньої санації. Також велюр-тампони порівняно з іншими інструментами не травмували слизову оболонку носового ходу, не викликали неприємних відчуттів.

В ході дослідження було встановлено, тампони відбирали найбільшу кількість кліти, які підраховували у гемоцитометрі, а також вони мають найбільші адсорбуючі властивості порівняно з тампонами із віскозного волокна.

Тому ми рекомендуємо для дітей, особливо раннього віку, дошкільного віку використовувати тампони із велюрового волокна для відбору мазків з носової порожнини з метою діагностики респіраторних інфекцій методом ПЛР.

Аналізуючи результати дослідження проведені у другій групі пацієнтів нами було встановлено, що урогенітальні цитощітки, поверхня яких вкрита велюровими війками мали великі адсорбуючі властивості порівняно з тампонами із вікозного волокна.

Щітки були зручними у використанні, так як мали гнучний стрижень з надсічкою для надлому, що значно полегшувало роботу. Також в результаті аналізу результатів отриманих з гемоцитометру, встановлено, що вони відбирали велику кількість епітеліальних клітин порівняно з тампонами із віскози.

Однак, враховуючи попередню санацію носових ходів, слід відмітити і декілька недоліків даного інструменту. Це неприємні відчуття після відбору біоматеріалу, подразнення слизової оболонки носового ходу, а у деяких пацієнтів після застосування інструменту починалася кровотеча. Проте, цитощітки виявилися ефективними для дослідження біоматеріалу методом ПЛР, тому ми рекомендуємо їх для використання у дітей від 3 років і старше.

Стосовно тампонів із вікозного волокна, до переваг можна віднести те, що вони в більшості випадків не травмували слизову оболонку, незважаючи на попередню її санацію.

Однак, було відмічено і недоліки інструментів: неприємні відчуття після процедури відбору, тампони не зручні у застосуванні (не мали надсічки для відлому на стрижні і лікарям доводилося відрізати кінчик ножицями, що ставило під сумнів якість дослідження, так як був ризик контамінації усіх зразків).

До переваг слід додати адсорбуючі властивості тампонів, що які досліджували шляхом підрахунку клітин у гемоцитометрі.

Для ПЛР-дослідження, вони виявилися не дуже ефективними, так як, тампони адсрбували багато транспортного середовища і після повторного струшування за допомогою мвкроцентрифуги не вдавалося відсадити достатню

кількість рідини, що ставило під сумнів ефективність виділення збудників. Тому їх можна пропонувати, як аналог для людей старшого віку.

При порівнянні транспортного середовища від компанії «Sorap» (Італія) (універсальне транспортне середовище для відбору біологічних зразків та для роботи з культурами клітин) та середовища від компанії «AmpliSens» (Росія) (транспортне середовище для респіраторних зразків) слід звернути увагу, що італійський продукт виявився набагато якіснішим порівняно з російським.

Транспортне середовище від «Sorap» не потрібно зберігати в морозильній камері на момент транспортування, воно могло зберігати свої властивості при кімнатній температурі 12 годин, а при зберіганні в холодильній камері 2 доби, у замороженому стані при температурі мінус 70 °С необмежений термін, на відміну від середовища від «AmpliSens». Його потрібно негайно після використання зберігати у замороженому стані, у розмороженому вигляді зберігає свої властивості протягом 1 години, а в холодильній камері - 4 години. Тому для роботи ефективнішим виявилось транспортне середовище італійського виробника.

Висновок до розділу 4.

Нами було розроблено алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції та інших респіраторних вірусних і бактеріальних збудників у дітей з інфекційним загостренням БА і БОС. Запропонований алгоритм дозволяє встановити наявність бокавірусної інфекції при інфекційному загостренні БА та БОС і значно підвищити ефективність етіологічної діагностики у дітей до 90,3 %.

Також було проведено дослідження на встановлення адсорбуючих властивостей інструментів для відбору біологічного матеріалу у дітей різного віку. Найбільш ефективними, за результатами дослідження виявилися велюр-тампони, які було запропоновано до використання немовлятам та дітей молодшого дошкільного віку та уrogenітальні цитощітки, які було запропоновано дітям старшого віку.

За матеріалами розділу опубліковано праці:

1. Соломко Ю. О. Алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції при загостненні бронхіальної астми у дітей / Ю. О. Соломко // Український пульмонологічний журнал. — Київ. - 2015. — № 4. — С. 27–31.

2. Соломко Ю. О. Оптимізація відбору біологічного матеріалу для виявлення респіраторних вірусів методом ПЛР / Ю.О. Соломко // Міжнародна науково-практична конференція «Сучасна медицина: актуальні питання»: тези. — Одеса. - 2015. — Т. 1, № 1 — С. 122–125.

3. Дзюблик І. В. Алгоритм лабораторної діагностики для виявлення респіраторних вірусних та бактеріальних збудників інфекційного загострення у дітей з бронхообструктивним синдромом / І. В. Дзюблик, О. В. Кукало, Ю. О. Соломко, О. М. Охотнікова, О. В. Шарікадзе, С. М. Руденко // (Інформаційний лист). — Київ. -2016. - № 72.

5. Дзюблик І. В. Детекція та ідентифікація вірусу грипу та інших респіраторних збудників методом полімеразної ланцюгової реакції в мультиплексному форматі у реальному часі / І. В. Дзюблик, О. В. Кукало, Ю. О. Соломко // (Інформаційний лист). — Київ. — 2016. - № 73.

РОЗДІЛ 5

ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ БОКАВІРУСІВ В УМОВАХ *IN VITRO* З НАСТУПНОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЮ ІДЕНТИФІКАЦІЄЮ ЗБУДНИКА

Класичні вірусологічні методи виділення та ідентифікації бокавірусу людини на часі не розроблені. В окремих дослідженнях описані спроби культивування бокавірусів в спеціалізованих клітинах бронхіального епітелію людини [204-206]. Проте, НВоV не вдається культивувати в стандартних перещеплювальних клітинних культурах в умовах *in vitro*. Відсутність ефективної та доступної для практичних лабораторій клітинної моделі для виділення та накопичення бокавірусів людини стало однією з основних перешкод на шляху подальшого та поглибленого вивчення біологічних властивостей цього збудника.

Нашим завданням було розробити метод культивування та виділення бокавірусів людини в умовах *in vitro* із наступною молекулярно-генетичною ідентифікацією збудника. При цьому, важливою складовою такого дослідження стали наступні етапи: скринінгові дослідження широко спектру стандартних перещеплювальних субстратзалежних культур клітин; пошук чутливої до вірусу культури клітин; індикація та ідентифікація збудника в процесі культивування сучасними методами молекулярної діагностики.

В роботі були використані 45 мазків з носової порожнини дітей, віком від 1,5 до 4,0 років із встановленою етіологією бокавірусної інфекції (45 НВоV людини позитивних зразків, підтверджених в ПЛР).

Для дослідження використовували субстратзалежні перещеплювальні культури клітин людини: НЕР-2, HeLa, L-41, одержані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіології імені Р.С. Кавецького НАН України. Також досліджували культури клітин тваринного походження: ПТП, MDCK, СНЕВ, одержані із Інституту ветеринарної медицини НАН України.

Детекцію бокавірусу на етапах культивування здійснювали методом ПЛР в реальному часі з використанням набору реагентів «Aniplex II RV 16 Detection (1.1)» виробництва «Seegene» (Корея).

НВoV-позитивні проби розморожували, розбавляли підтримуючим середовищем без сироватки, деконтамінували фільтруванням, аліквотували і зберігали при температурі -20°C до моменту культивування.

Культивування бокавірусів в перещеплювальних клітинних лініях здійснювали мікрометодом у 96-лункових культуральних планшетах «Sarstedt» (Німеччина) впродовж трьох пасажів з контролем цитопатичної дії збудника (ЦПД) під інвертованим мікроскопом «Primo Vert», (Німеччина) з фазовим контрастуванням зображення та його візуалізацією і фотографуванням з використанням AxioCam Eric 5s.

Визначення інфекційного титру вірусу проводили шляхом внесення десятикратних робочих розведень вірусомісної культуральної рідини на моношари клітинних культур, на яких виділяли бокавірус. Використовували контроль культури клітин (КК).

Всі 45-позитивних зразків були внесені в об'ємі 0,01 та 0,02 мл на клітинні моношари культур: HEP-2, HeLa, L-41, ПТП, MDCK, СНЕВ.

Після адсорбції впродовж 60 хв в кожну лунку вносили підтримуюче середовище до кінцевого об'єму 0,1 мл. Інфіковані культури інкубували при 37°C в атмосфері 5 % CO_2 впродовж 72 годин з контролем прояву ЦПД кожні 24 години. Було встановлено, що із 6 клітинних культур, тільки в культурі ПТП була зареєстрована ЦПД НВoV1 для зразків № 3, 36, 37 (рис. 5.1)

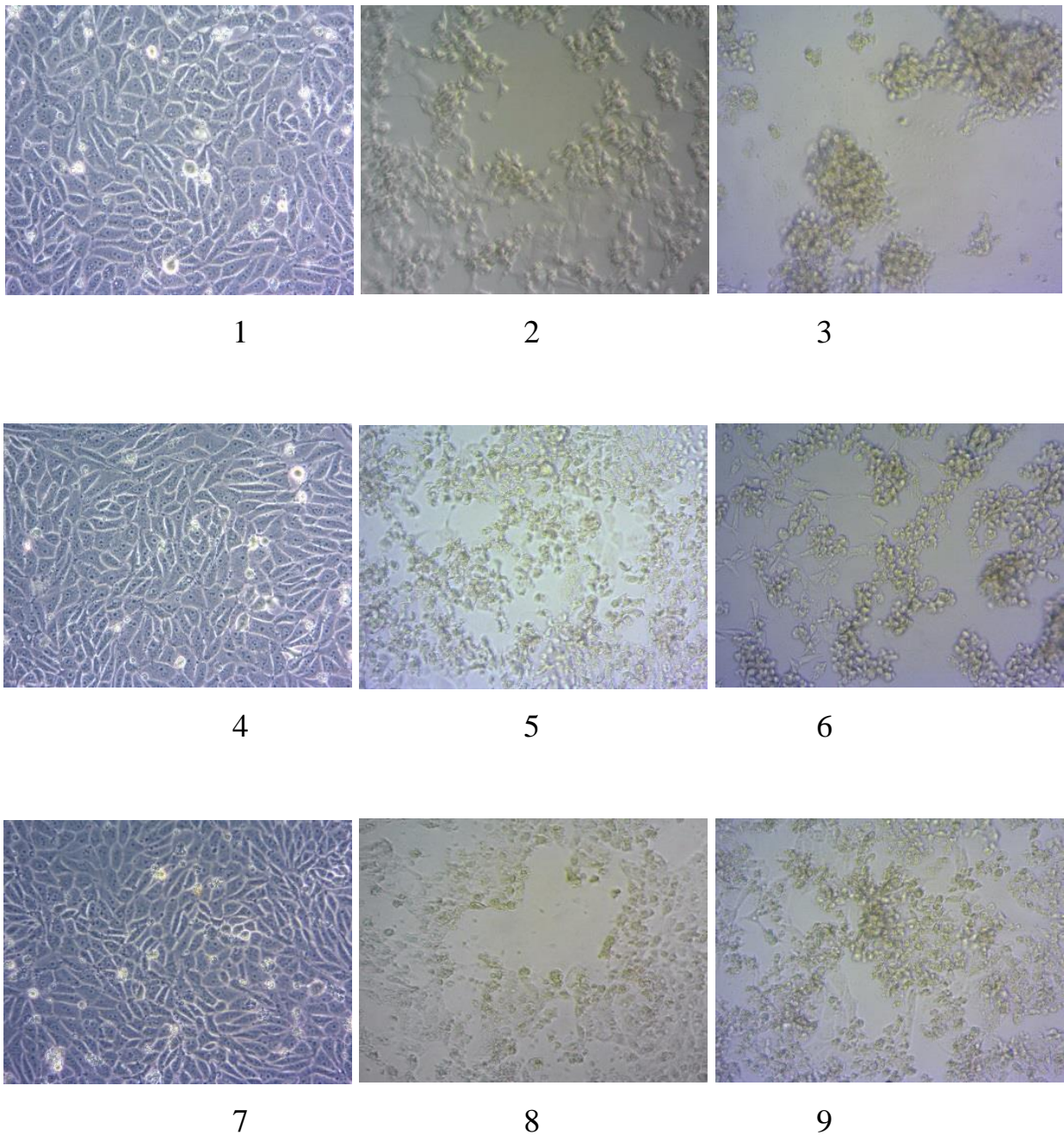


Рис. 5.1. ЦПД бокавірусу людини 1 типу в культурі клітин перещеплених тестикул поросят (об'єктив 20х, окуляр 10х):

1, 4, 7 — інтактна культура (контроль клітин);

2, 3 — через 48 і 72 години після інфікування клінічним зразком №3;

5, 6 — через 48 і 72 години після інфікування клінічним зразком №36;

8, 9 — через 48 і 72 години після інфікування клінічним зразком №37.

ЦПД супроводжувалась порушенням цілісності клітинного моношару і появою осередків округло-клітинної дегенерації спочатку на периферії моношару

з наступним залученням в цей процес всіх клітин та їх поступовим відшаруванням від поверхні росту через 72 години (див. рис. 6.1).

Характер ЦПД та динаміка її формування у досліджених зразках №3 і №37 були однаковими на всіх трьох пасажах. Для зразка №36 ЦПД проявлялось через 24 години і досягало 100 % через 48–78 годин культивування. Для зразків №3 і №37 ЦПД проявлялась через 48 год досягаючи максимальних значень через 72 год. (рис. 5.2):

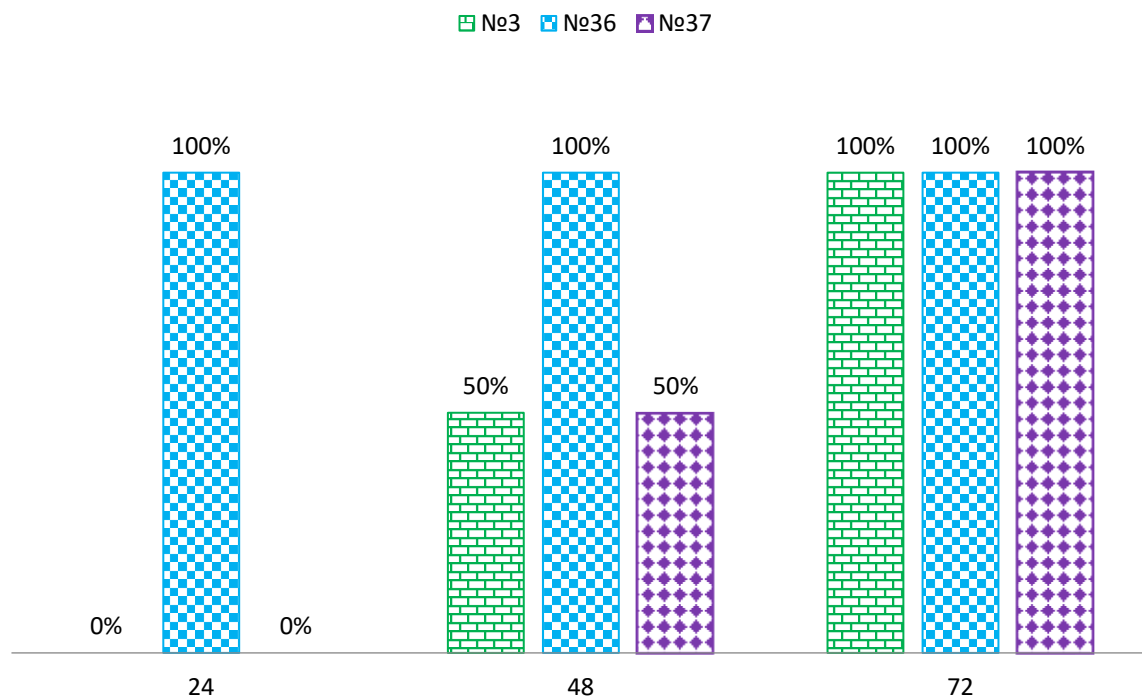


Рис. 5.2. Особливості динаміки формування ЦПД (%) бокавірусів людини виділених із біологічних зразків №3, №36, №37 на третьому пасажі в культурі клітин ПТП

Показано, що ЦПД НВов1 у біологічних зразках №№ 3, 36, 37 через 72 години від моменту інокуляції на першому, другому і третьому пасажах виявлялась тільки в культурі клітин поросяти ПТП і в жодному разі не виявлялась в культурах клітин людини НЕР-2, HeLa, L-41, MDCK, СНЕВ. Для визначення динаміки формування цитопатичного ефекту ми також використовували дослідження серії пофарбованих препаратів, на різних етапах розвитку інфекційного процесу в клітинах, а саме через 24, 48, 72 години. Вважали доцільним застосувати метод фарбування препаратів

акрединовим помаранчевим (акрединовий оранжевий). Цей метод фарбування дозволяє не тільки оцінити характер і динаміку ЦПД, але і визначати РНКові та ДНКові структури (РНК-структури фарбуються в рубіново-червоний колір, ДНК — в жовто-зелений). Такий метод фарбування дозволяє виявити нуклеїнові кислоти вірусу та клітини, можливі дегенеративні зміни в клітині, які належать до неспецифічних процесів і реєструються на ранніх етапах інфекційного процесу, і у більшості узгоджуються з даними отриманими при використанні інших методів застосовуваних у гістохімії, як видно з рисунку 5.3.

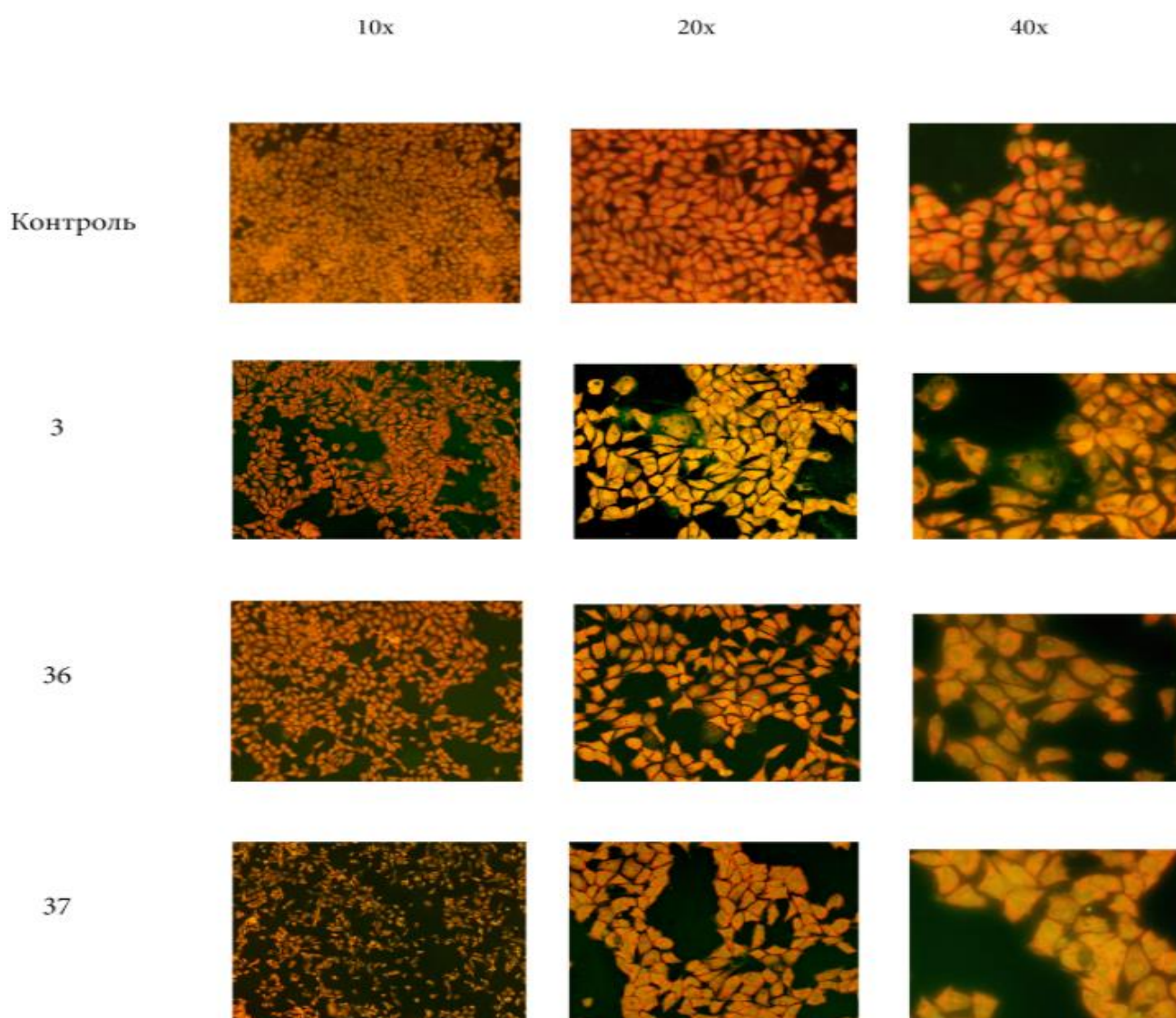


Рис. 5.3. ЦПД бокавірусу людини в ПТП для біологічних зразків №3, №36, №37

Нами встановлено особливості дегенеративних змін в клітинах культури ПТП:

поліхроматична флюоресценція нуклеїнових кислот (забарвлення ядра клітин жовто-зеленим кольором, РНК рубіново-червоним), темно-зелене забарвлення включень в перинуклеарній зоні (від 3–5 елементів), внутрішньоядерні включення – яскраво-жовтого світіння, зміщення ядра, зникнення ядерця. В контролі клітин подібних змін не виявлено.

Слід зазначити, що сприйнятливість культур клітин ПТП до інфікування бокавірусом людини була найбільшою при внесенні зразків на початку логарифмічної фази росту культури, коли у всій популяції переважали живі клітини, а частка нежиттєздатних клітин була найменшою. Цим самим збільшувалась ефективність методу культивування в ПТП. Інфекційний титр бокавірусів в культурі клітин ПТП досягав значень $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1\text{мл}$ і більше.

На всіх етапах культивування в 6-ти перещеплювальних культурах клітин здійснювали молекулярно-генетичну детекцію та ідентифікацію бокавірусу людини за допомогою набору реагентів: «Nucleo Spin Dx Virus», зворотну транскрипцію за допомогою набору «cDNA Synthesis Premix V 1.1», а ампліфікацію набором «Amplicon TM II RV 16» «Seegene» (Німеччина). Використовували панелі А і В.

Панель А дозволяє проводити одномоментну ампліфікацію мішені нуклеїнової кислоти восьми респіраторних вірусів: Influenza A virus (Flu A), Influenza B virus (Flu B), Human adenovirus (AdV), Human parainfluenza virus 1 (PIV1), Human parainfluenza virus 2 (PIV2), Human parainfluenza virus 3 (PIV3), Human parainfluenza virus 4 (PIV4), Human rhinovirus A/B/C (HRV A/B/C).

Панель В дозволяє проводити одномоментну ампліфікацію мішені нуклеїнової кислоти восьми респіраторних вірусів: Human respiratory syncytial virus A (RSV A), Human respiratory syncytial virus B (RSV B), Human metapneumovirus (MPV), Human coronavirus 229E (229E), Human coronavirus NL63 (NL63), Human coronavirus OC43 (OC43), Human bocavirus 1/2/3/4 (HBoV), Human enterovirus (HEV).

Використання даної тест-системи в нашій роботі надало нам наступні переваги: якісний та напівкількісний аналіз, швидкість в застосуванні, одночасне виявлення 16 респіраторних актуальних вірусних збудників по двом каналам А і В.

Молекулярно-генетичний контроль методом ПЛР в зразках здійснювали не

залежно від того наявна чи відсутня ЦПД вірусу. Виявляли та диференціювали мішені ДНК бокавірусу відповідно до внутрішнього контролю (IC-50 копій/мл), який є екзогенним і контролює етап виділення ДНК НВoV1 (рис. 5.4).

Anyplex™ II RV16 Detection v1.1 (96 plate)

Образец №			
Данные/номер пациента		ФИО пациента	9
Ячейка	[A02, A08]	Время проведения анализа	2015-05-07

- SAMPLE -

Авто интерпретация	FAM		HEX			Cal Red 610			IC
	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	
НВoV	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	MPV	НВoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSVB	HEV	IC
	-	++	-	-	-	-	-	-	++

- POSITIVE CONTROL -

Авто интерпретация	FAM		HEX			Cal Red 610			IC
	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	
Positive Control(+)	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
	MPV	НВoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSVB	HEV	IC
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- NEGATIVE CONTROL -

Авто интерпретация	FAM		HEX			Cal Red 610			IC
	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	
Negative Control(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MPV	НВoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSVB	HEV	IC
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- GRAPH -

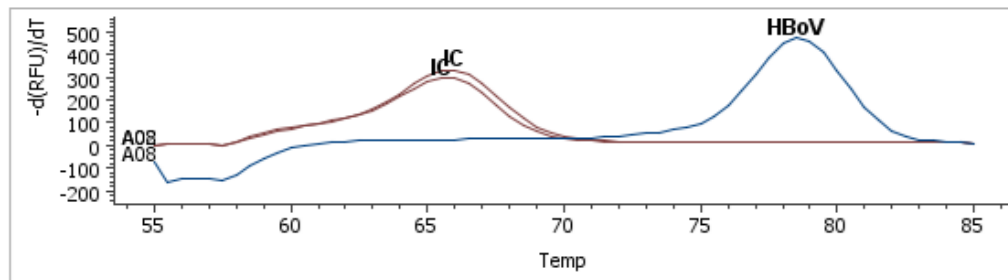


Рис. 5.4. Ідентифікація бокавірусу людини на третьому пасажі (через 72 години) культивування в клітинах ПТП методом ПЛР в реальному часі тест-системою Anyplex II RV 16 Detection (1.1). Клінічний зразок №3

В результаті проведеного дослідження встановлено, що культура клітин ПТП виявилась чутливою та пермісивною по відношенню до НВоV1 людини і придатною для його пасажування з накопиченням збудника, інфекційний титр якого визначався у межах 2,0–2,5 lg ТЦД₅₀/0,1 мл і більше. Вибіркова здатність НВоV1 людини до репродукції саме в культурі клітин ПТП обумовлена, на нашу думку, генетичною спорідненістю між бокавірусами людини та свиней, що передбачає наявність у них вираженої гомології капсидних білків і спільних механізмів ранніх етапів репродукції, оскільки проникнення бокавірусів, як і всіх парвовірусів, в клітину відбувається за допомогою клатрин-асоційованого ендоцитозу [200].

Це дозволило обґрунтувати доцільність використання гетерологічної перещеплювальної культури клітин тестикул поросят ПТП для культивування НВоV1 людини. Нині ця культура зареєстрована у Російській колекції клітинних культур хребетних тварин.

Вона культивується в синтетичних живильних середовищах з додаванням 5–10 % сироватки крові ембріонів корів, добре адаптується до умов культивування, доступна для практичних вірусологічних лабораторій в Україні.

Висновок до розділу 5

Представлені дослідження мають широкі перспективи щодо вивчення особливостей взаємодії бокавірусів з клітиною господаря, удосконалення лабораторної діагностики бокавірусної інфекції, впровадження в систему доклінічних випробувань противірусних хіміопрепаратів та дезінфектантів. Важливо підкреслити, що при виборі клітинних культур значну увагу було приділено походженню клітинних культур, генетичній спорідненості бокавірусів людини і бокавірусів свиней, режимам культивування, посівній концентрації клітин, тощо. Вважали обов'язковим включення до скринінгових досліджень з пошуку чутливих до бокавірусів культур клітин, як гомологічних (людських), так гетерологічних (тваринних) субстратзалежних культур клітин.

Таким чином нами розроблена методика виділення та культивування бокавірусів людини з використанням гетерологічної субстратзалежної культури клітин ПТП з наступною ідентифікацією збудника методом ПЛР, яка здійснюється в три етапи:

- 1) відбір біологічних проб (мазків з носової порожнини у хворих на ГРВІ);
- 2) триразове пасажування біологічного матеріалу у культурі клітин ПТП з контролем прояву ЦПД вірусу;
- 3) ідентифікація НВоV1 людини методом мультиплексної ПЛР в режимі реального часу (РЧ-ПЛР-МФ). Пропонується до впровадження метод РЧ-ПЛР-МФ для детекції та ідентифікації НВоV1 людини одночасно з іншими актуальними респіраторними вірусами, на двох панелях А і В по технології TOCE-tm, яка робить можливим виявлення від 8 до 16 патогенів в одному флуоресцентному каналі.

За матеріалами розділу опубліковано праці:

1. Соломко Ю. О. Культивування бокавірусів людини першого типу в умовах *in vitro* в диференційованих клітинах ПТП / Ю. О. Соломко, О. П. Трохименко, І. В. Дзюблик // Збірник наукових праць НМАПО імені П.Л. Шупика. – Київ. - 2015. — Кн. 1 (24). — С. 222–227.
2. Дзюблик І. В. Культивування бокавірусів людини в умовах *in vitro* з наступною молекулярно-генетичною ідентифікацією збудника / І. В. Дзюблик, Ю. О. Соломко, О. П. Трохименко // Профілактична медицина. — К.іів. - 2015. — № 4. — С. 112–118.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Грип та інші ГРВІ є найбільш поширеною інфекційною патологією, як у дорослих, так і у дітей.

Згідно даних Міністерства охорони здоров'я України в 2011 році, до початку наших досліджень на долю грипу та ГРВІ припадало від 91,2 % (у 1999 р.) до 95,2 % (у 2010 р.) усіх випадків інфекційної патології. Така поширеність грипу та інших ГРВІ дозволяє вважати цю проблему стратегічно важливою медичною проблемою, яка потребує впровадження ефективних уніфікованих протиепідемічних заходів та їх чіткої координації для мінімізації рівня захворюваності, соціальних та економічних втрат.

ГРЗ, серед яких домінують ураження вірусної етіології, призводять до 80–85 % випадків загострення БА у дітей і приблизно 75 % випадків у дорослих [8].

ГРЗ та загостренням БА підтверджує пряма кореляція між сезонним підйомом рівня захворюваності на ГРВІ і частотою загострень БА.

Ураження респіраторного тракту людини можуть викликати більше 200 видів охарактеризованих респіраторних вірусів, які належать до 6 родин: ортоміксовіруси (*Orthomyxoviridae*), параміксовіруси (*Paramyxoviridae*), пікорнавіруси (*Picornaviridae*), коронавіруси (*Coronaviridae*), аденовіруси (*Adenoviridae*) та парвовіруси (*Parvoviridae*) [208].

Бронхіальну обструкцію здатні викликати різні представники цих родин: віруси грипу А і В, віруси парагрипу 1–4 типів, респіраторно-синцитіальний вірус А і В, 21 серотип риновірусів, аденовіруси групи В (серотипи 3, 7, 14, 21, 34, 35), аденовіруси групи С (серотипи 2, 1), аденовіруси групи Е (серотип 4), коронавіруси людини (229Е, OC43, SARS-NCoV), ентеровіруси, метапневмовірус людини та ін.

Найчастіше (до 80 % випадків) у дорослих і дітей старшого віку причиною виникнення інфекційного загострення БА та БОС є риновіруси.

Пацієнти з БА та БОС більш схильні до інфекції верхніх дихальних шляхів, яка викликана риновірусами, ніж здорові люди, а перебіг інфекції нижніх дихальних шляхів у них більш тривалий і тяжкий. Ці віруси можуть провокувати

напади астми самостійно або підсилювати дію алергенів. Вони є найбільш поширеними, але мікст-інфекція з іншими вірусами також може мати місце. У дітей молодшого віку основну роль у виникненні БА та БОС відіграє РС-вірус.

Вірусна інфекція не тільки викликає загострення БА та БОС, але й значно ускладнює та пролонгує перебіг захворювання. У хворих на астму із симптомами ГРВІ спостерігаються більш виражені порушення вентиляційної функції легень, а збільшена бронхіальна гіперчутливість може зберігатися після перенесеної ГРВІ упродовж 5-11 тижнів. Також встановлений безпосередній зв'язок між вірусною інфекцією і летальним наслідком загострення хвороби.

Патогенний вплив вірусних агентів на стан і властивості слизової дихальних шляхів сприяє погіршенню мукоциліарного кліренсу і фагоцитарної активності альвеолярних макрофагів. Це створює оптимальні умови для приєднання бактеріальної інфекції та формування вірусно-бактеріальних асоціацій.

Найчастіше на фоні ГРВІ виявляють інфікування *M. pneumoniae* та *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* і *M. catarrhalis*, що призводить до більш тривалого і тяжкого перебігу загострення БА та БОС.

Вперше бокавірус людини був виявлений та ідентифікований у 2005 році у дітей з ГРЗ в Швеції. За період з 2006 по 2010 роки послідовно були відкриті ще три типи бокавірусів людини – НВоV2, НВоV3, НВоV4 [6–9].

Усі 4 типи бокавірусів людини були віднесені до родини *Parvoviridae*, підродина *Parvovirinae*, роду *Vocavirus*.

За останні роки НВоV1 людини був виявлений у 1,5–19,0 % хворих на ГРВІ дітей Австралії, Японії, Канади, США, Франції, Німеччини, Великої Британії, Швейцарії, Фінляндії, Італії, Нідерландів та країн Близького Сходу.

Встановлено, що НВоV-інфекція зайняла одне з перших місць серед ГРВІ у дитячого населення Європи. Так, в Німеччині, ГРВІ, що викликані НВоV1, посіли друге місце після РС-інфекції, в Італії – третє місце, поступаючись лише РС-вірусній та риновірусній інфекціям, у Фінляндії – четверте місце. Показано, що шлунково-кишкові розлади наявні майже у 25 % пацієнтів з НВоV1 респіраторною інфекцією, що свідчить про те що НВоV1 інфекція не може бути обмеженою тільки

дихальними шляхами.

Є окремі повідомлення про виділення та ідентифікацію бокавірусів у хворих на негоспітальну пневмонію, БА та БОС.

Через те, що бокавіруси людини були ідентифіковані та визнані як «нові» збудники лише нещодавно, багато питань, що стосуються їх поширення, особливостей епідемічного процесу, ролі та місця в структурі захворюваності, основних клінічних проявів захворювань, пов'язаних з ними, ще не досить вивчені. Необхідно відмітити відсутність будь-яких даних щодо біологічних, молекулярно-генетичних властивостей циркулюючих НВoV на теренах України. Не визначені сезонність та вікові особливості бокавірусної інфекції, місце та роль НВoV людини в етіологічній структурі захворювань дихальних шляхів серед дитячого населення України та можливі наслідки захворювання. Відомо, що клінічні прояви ГРВІ, викликаних різними класичними респіраторними вірусами, є практично однаковими. Крім того, схожі клінічні прояви можуть спостерігатися при захворюваннях, зумовлених бактеріальними збудниками. Проте які вони при бокавірусній інфекції?

У світовій практиці охорони здоров'я вирішальну роль у підтвердженні клінічного діагнозу відіграє лабораторна діагностика. Не викликає сумнівів той факт, що тільки своєчасна та ефективна лабораторна діагностика здатна забезпечити правильний вибір тактики лікування.

Проведений нами аналіз літературних джерел показав, що практично у більшості випадків спроби визначити етіологічну роль «нових» вірусів традиційними (класичними) методами вірусологічної діагностики є невдалими. Неефективність традиційних методів лабораторної діагностики, що базуються на виділенні та ідентифікації респіраторних вірусів на курячих ембріонах, в культурах клітин, на визначенні антигенів та специфічних антитіл методами імуноферментного аналізу або методом флуоресціюючих антитіл, тощо ставлять питання удосконалення етіологічної діагностики ГРВІ, в тому числі «нової» бокавірусної інфекції, в ряд найбільш актуальних задач сучасної медицини.

Ми поставили за мету нашої роботи дослідити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій у госпіталізованих дітей України та удосконалити лабораторну діагностику бокавірусної інфекції на основі використання сучасних молекулярно-генетичних методів.

Для досягнення поставленої мети, ми поставили перед собою наступні задачі дослідження:

1. Встановити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей.
2. Вивчити роль бокавірусів людини в етіологічній структурі інфекційного загострення бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у дітей.
3. Дослідити молекулярно-генетичні особливості бокавірусу людини.
4. Удосконалити лабораторну діагностику бокавірусної інфекції.
5. Розробити та науково обґрунтувати алгоритм лабораторної діагностики бокавірусної інфекції у дітей на основі застосування сучасних молекулярно-генетичних методів.
6. Розробити метод культивування та виділення бокавірусу людини в перещеплюваних культурах клітин в умовах *in vitro* для поглибленого вивчення біологічних властивостей збудника.

Для виконання поставлених задач застосовували наступні методи дослідження:

1. Вірусологічні методи: культивування перещеплюваних субстратзалежних культур клітин макро- і мікрометодами; зараження, адаптація, виділення та індикація бокавірусів за цитопатичною дією у культурах клітин мікрометодом; фарбування препаратів; світлова та люмінесцентна мікроскопія.
2. Експрес-методи: методи на основі імунохроматографічного аналізу (швидкі ІХА-тести).
3. Молекулярно-генетичні методи дослідження: виділення геномної вірусної ДНК/РНК, ПЛР із зворотною транскрипцією, полімеразна ланцюгова реакція в моно- и мультиплексному форматах з детекцією продукту

ампліфікації в реальному часі, секвенування.

4. Генотипування бокавірусу людини із застосуванням конформаційного тесту «VIASUR» та методу Сенгера.

Досліджували роль бока-вірусів людини в етіологічній структурі ГРВІ за період з жовтня 2012 року по грудень 2014 років. Обстежено 97 дітей віком від 3 місяців до 15 років, у середньому ($39,5 \pm 2,5$) місяця, які знаходилися на лікуванні в інфекційному відділенні у Львівській дитячій міській клінічній лікарні. Серед них хлопчиків було 51 (52,6 %), а дівчаток – 46 (47,4 %). Госпіталізованих пацієнтів рандомізовано за віком на чотири групи: перша група налічувала 12 дітей віком від 3 місяців до 1 року (12,3 %), друга - нараховувала 67 дітей віком 1-3 роки (69,0 %), третя - 10 дітей 3-5-річного віку (10,3 %) і четверта - 8 дітей старше 5 років (8,2 %).

Для етіологічної діагностики використовували метод ПЛР у мультиплексному форматі на 12 та на 16 вірусних збудників: бокавіруси (HBoV), аденовіруси (HAdV-B, C, E), вірусів парагрипу (HPiV 1-4), коронавіруси (HCoV - OC43, E229, NL63, HKU1), риновірус (HRV), РС-вірус (HRsV A, B), метапневмовірус (HMPV).

Встановлено, що значну перевагу серед респіраторних вірусних збудників в етіологічній структурі ГРВІ мали бокавіруси людини (42,3 %). Дещо з меншою частотою виявляли віруси парагрипу (21,2 %), аденовіруси (19,2 %), риновіруси (9,7 %), РС-віруси та метапневмовірус по 3,8 % відповідно.

Крім того, досліджували частоту виявлення бокавірусів в етіологічній структурі ГРВІ у дітей різних вікових груп. У хворих другої групи HBoV виявлено у 25,0 %, у третьої групи в 15,4 %, зі значно меншою частотою в четвертій групі - 1,9 %. Бокавірус людини взагалі не виявляли в групі хворих дітей до 1 року.

Бокавірусну моно-інфекцію визначали в 45,5 %, а мікст-інфекцію («бокавірус + риновірус», «бокавірус + аденовірус») в 54,5 % випадків.

Оцінюючи особливості клінічного перебігу бокавірусної інфекції відмічено, що більшість пацієнтів були госпіталізовані в стаціонар на 6-18 годину від початку захворювання. Причиною звернення було: біль у горлі, нежить, задишка, неспокій, висока температура тіла, сильний кашель.

Вивчали роль бокавірусів людини при інфекційному загостренні БА та БОС у дітей. При цьому обстежено 66 дітей віком від 3 місяців до 6 років середній вік пацієнтів становив $(36,3 \pm 2,5)$ місяців, госпіталізованих до Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» в період з 2012-2013 роки.

З діагнозом БА у дослідження включено 28 осіб (42,4 %), а з БОС – 38 осіб (57,6 %).

Серед них хлопчиків було 46 (69,7 %), а дівчаток – 20 (30,3 %). Методом рандомізації, діти були розподілені на чотири групи за віком. Першу групу склали 17 осіб віком до 1 року, другу - 21 особа віком від 1 до 3 років, третю – 23 дитини від 3 до 5 років, четверту – 5 осіб старше 5 років. У контрольну групу вийшли 12 дітей I і II груп здоров'я. Всього було обстежено 78 дітей.

Діагноз БА встановлювали відповідно до Наказу МОЗ України № 767 від 27.12.2005 року «Про затвердження протоколів діагностики та лікування алергологічних хвороб у дітей» та № 868 від 08.10.2013 року «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі».

Для виявлення вірусних респіраторних збудників, в тому числі, бокавірусів людини застосовували ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 збудників. В результаті ПЛР-дослідження БА виявлено HBoV у 53,6 %, HRsV – 17,8 %, HAdV – 14,3 %, HRV – 7,1 %, а HMPV і HPiV по 3,6 % випадків. У пацієнтів із БОС HBoV був ідентифікований у 30,4 % випадків, HRsV, HRV та HMPV - у 17,4 % відповідно, а HAdV і HPiV - у 8,73 % випадків відповідно.

У результаті проведеного дослідження встановлена чітка залежність індикації бокавірусу в залежності від віку дитини, так у першій віковій групі HBoV виявляли в 7,1 % випадків, у другій групі в 23,8 %, у третій групі в 19,0 %, а в четвертій – його взагалі не виявляли.

Серед хворих з інфекційним загостренням БА та БОС у яких виявляли бокавірус людини, моно-інфекція була встановлена в 86,4 % випадків, а мікст-інфекція («бокавірус + риновірус + аденовірус» і «бокавірус + РС-вірус + аденовірус») – у

13,6 % випадків.

Попередній аналіз показав, що частота епізодів ГРВІ у хворих БА становила ($1,5 \pm 0,2$ епізоду) і була практично такою ж ($p > 0,05$), як і у дітей ($1,6 \pm 0,3$ епізоду). Середній вік появи перших епізодів ГРВІ у дітей з БА складав ($21,0 \pm 1,5$) місяця, а у дітей з БОС – ($21,7 \pm 1,1$) місяця, що свідчило про ранню маніфестацію хвороби. Час, що проходив від маніфестації ознак БА до встановлення діагнозу, в середньому становив ($19,7 \pm 1,6$) місяця, що пов'язано з труднощами встановлення діагнозу у ранньому віці.

У всіх вікових групах були відмічені катаральні явища різних ступенів важкості. Достовірних відмінностей по частоті виявлення таких симптомів, як закладеність носа та ринорея не було виявлено ($p > 0,05$). Гіперемію зіву відмічали в кожній віковій групі і особливо часто у пацієнтів віком від 3 до 5 років. Наведені дані свідчать про те, що за клінічними симптомами встановити причину захворювання немає можливості, що підкреслює необхідність лабораторної ідентифікації збудника інфекції.

Проводилась ідентифікація таких респіраторних патогенів, як віруси парагрипу, аденовіруси, риновіруси, метапневмовірус і бокавірус по раках. Так, у 2012 році респіраторні віруси були виявлені в ($72,2 \pm 5,3$) % випадків, у 2013 році – в ($53,6 \pm 7,8$) %, у 2014 році – в ($52,0 \pm 7,1$) % випадків.

Встановлено, що в різні роки серед всіх респіраторних вірусів частота виявлення бокавірусу при моно-інфекції варіювала в межах ($36,5 \pm 6,7$) %, а при мікст-інфекції - ($8,0 \pm 5,5$) % до ($21 \pm 5,6$).

Встановлено, що частота виявлення бокавірусу людини коливалася в широких межах упродовж року та чітко характеризувалася двома піками: один із них припадав на вересень-жовтень, а другий – на весняний період з максимальним виявленням у квітні місяці.

Важливою задачею дисертаційного дослідження було вивчення молекулярно-генетичних особливостей бокавірусів людини виявлених у дітей за період 2012-2014 роки в Україні. В нашому дослідженні, також було застосовано підтверджуючий тест «Viasure Bocavirus Real-time Detection Kit» («Cer Test»,

Іспанія), який призначений для виявлення лише НВоV1.

В основу методу покладено принцип ПЛР у моноплексному форматі з детекцією продуктів реакції в режимі реального часу. Вивчено всі позитивні на НВоV проби, які попередньо протестовано за допомогою ПЛР у мультиплексному форматі на 12-16 респіраторних збудників. В результаті проведеного дослідження всіх позитивні зразки були ідентифіковані, як НВоV1.

Для характеристики генотипу НВоV нами застосовано метод Сенгера (1977), який виконували в референс-центрі з моніторингу за збудниками інфекцій дихальних шляхів ФБУН ЦНІЕ. В основу методу покладено принцип синтезу комплементарного ланцюга на основі мДНК за допомогою ДНК-полімерази. Філогенетичне дерево будували методом поєднання найближчих сусідів із застосуванням перестановочного аналізу статистичної значимості сконструйованого дерева по 500 реплікам.

Порівняння та аналіз нуклеотидних послідовностей виконували за допомогою алгоритму BLAST 2.2.24 із застосуванням серверу Національного центру біотехнологічної інформації «NCBI», (США), який включав в себе бази даних GenBank (США), EMBL (Європа) і DDBJ (Японія).

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що НВоV1 відіграє провідну роль в етіологічній структурі у хворих на ГРВІ та інфекційне загострення БА та БОС, а також про переважну його циркуляцію на території України.

Аналіз власних досліджень щодо використання ПЛР у мультиплексному форматі дозволив науково обґрунтувати і запропонувати алгоритм етіологічної лабораторної діагностики респіраторних інфекції, в тому числі НВоV, який базується на двох різних методичних підходах. Це індикація антигенів респіраторних вірусних і бактеріальних агентів та детекція геномної ДНК/РНК збудників.

За першого підходу застосовували сучасні високочутливі та високоспецифічні швидкі ІХА-тести, а за другого – ПЛР у мультиплексному форматі. Включення до алгоритму діагностики високотехнологічної ПЛР у мультиплексному форматі в комплексі зі швидкими ІХА-тестами дозволило не

тільки ідентифікувати бокавірус людини, але й виявити випадки бокавірусної мікст-інфекції з іншими збудниками вірусної або бактеріальної природи.

Впровадження алгоритму у практику охорони здоров'я дозволило встановити наявність бокавірусної інфекції при ГРВІ та при інфекційному загостренні БА і БОС та значно підвищити ефективність етіологічної діагностики респіраторних інфекцій у дітей до 90,3 %.

Важливою складовою роботи стало експериментальне дослідження та розробка методу виділення та культивування НВоV1. В роботі використано 45 позитивних на НВоV1 зразків, проведено скринінг 6 ліній клітин (HEP-2, HeLa, L-41, ПТП, MDCK, СНЕВ). Культивування, накопичення та визначення інфекційного титру бокавірусу людини за цитопатичною дією (ЦПД) в перещеплюваних клітинних лініях, здійснювали мікрометодом у 96-лункових культуральних планшетах «Sarstedt» впродовж трьох пасажів, з контролем ЦПД збудника під інвертованим мікроскопом «Primo Vert» (Німеччина) з фазовим контрастуванням зображення та його візуалізацією і фотографуванням з використанням Axio Cam Erc 5s.

Встановлено, що із 6 клітинних культур тільки в культурі клітин ПТП була виявлена та підтверджена стабільна репродукція НВоV1 і детекція з чіткою ЦПД. Цитопатична дія супроводжувалась порушенням цілісності клітинного моношару і появою осередків округло-клітинної дегенерації спочатку на периферії моношару з наступним залученням в цей процес усіх клітин та їх поступовим відшаруванням від поверхні росту через 72 години. Ефективність запропонованого методу на всіх етапах культивування була підтверджена молекулярно-генетичною детекцією НВоV1 методом ПЛР у мультиплексному форматі тест-системою «Anyplex II RV 16 Detection (1.1)» («Seegene», Корея).

У результаті проведеного дослідження встановлено, що культура клітин ПТП є пермісивною по відношенню до НВоV1 і придатною для його пасажування з накопиченням збудника в титрах 2,0-2,5 lg ТЦД₅₀/0,1 мл і більше.

Це дозволило обґрунтувати доцільність використання культури клітин ПТП для культивування НВoV1 з метою поглибленого вивчення біологічних властивостей збудника, протівірусної дії хіміопрепаратів, дезінфектантів, тощо.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішена актуальна науково-практична задача сучасної медичної вірусології, щодо удосконалення лабораторної діагностики бокавірусної інфекції та встановлення ролі бокавірусу людини першого генотипу у спричиненні гострих респіраторних вірусних інфекцій та інфекційного загострення бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у дітей України.

1. Встановлена етіологічна роль бокавірусу людини у виникненні гострих респіраторних вірусних інфекцій у госпіталізованих дітей. Показано, що в етіологічній структурі гострих респіраторних вірусних інфекцій за період з 2012 по 2014 роки ідентифіковано бокавіруси в 42,3 %, віруси парагрипу у 21,2 %, аденовіруси - 19,2 %, риновіруси - 9,7 %, РС-вірус - 3,8 %, метапневмовірус - 3,8 % випадків. Найбільш часто НВoV виявляли у віковій групі від 1 до 3 років (25 % випадків) та в групі дітей від 3 до 5 років (15,4 % випадків). Визначено бокавірусну моно-інфекцію у 45,5 % та бокавірусну мікст-інфекцію «бокавірус + риновірус», бокавірус + аденовірус» у 54,5 % випадків.

2. Проведено ідентифікацію бокавірусу людини при інфекційному загостренні бронхіальної астми та бронхообструктивного синдрому у дітей. Так, при бронхіальній астмі бокавіруси людини було виявлено у 53,6 %, РС-віруси у 17,8 %, аденовіруси – 14,3 %, риновірус – 7,1 %, а метапневмовірус і віруси парагрипу по 3,6 % випадків відповідно. При бронхообструктивному синдромі бокавіруси було ідентифіковано у 30,4 %, риновірус, РС-вірус і метапневмовірус по 17,4 %, а віруси парагрипу та аденовіруси по 8,7 % відповідно.

Бокавірусна моно-інфекція була виявлена в 86,4 % випадків, а бокавірусна мікст-інфекція «бокавірус + риновірус + аденовірусу» та «бокавірус + РС-вірус + аденовірус» у 13,6 % випадків. Найбільш часто бокавірусну інфекцію виявляли у вікових групах від 1 до 3 років (23,8 %) і від 3 до 5 років (19,0 %).

3. Встановлено, що частота виявлення бокавірусу людини коливається в широких межах упродовж року та чітко характеризувалася двома піками: один з них припадає на вересень-жовтень місяці, а другий - на весняний період з максимальним виявленням у квітні місяці.

4. Дослідження молекулярно-генетичної різноманітності ізолятів бокавірусу людини виявлених у 2012-2014 роках показало, що у дітей з гострими респіраторними вірусними інфекціями та з інфекційним загостренням бронхіальної астми і бронхообструктивного синдрому виявлявся бокавірус людини 1 типу.

5. Удосконалено лабораторну діагностику бокавірусної інфекції шляхом впровадження методу полімеразної ланцюгової реакції у моноплексному та мультиплексному форматах. Науково обґрунтовано алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції, який включає в себе комплекс сучасних молекулярно-генетичних методів ідентифікації бокавірусів та інших бактеріальних і вірусних збудників на платформі полімеразної ланцюгової реакції у мультиплексному форматі та експрес-діагностику швидкими ІХА-тестами, що дає можливість підвищити ефективність лабораторної діагностики у 90,3 %.

6. Розроблено метод культивування та виділення НВоV1 в перещеплюваній субстратзалежній культурі клітин тестикул поросят в умовах *in vitro* із наступною молекулярно-генетичною ідентифікацією НВоV1 для поглибленого вивчення біоло-гічних властивостей збудника, противірусної дії хіміопрепаратів, дезінфектантів.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для встановлення етіологічного діагнозу бокавірусної інфекції у дітей з клінічними проявами ГРВІ та при інфекційному загостренні БА і БОС запропоновано застосування методу ПЛР у мультиплексному форматі.

Для оптимізації преаналітичного етапу при молекулярно-генетичних дослідженнях на бокавіруси, запропоновано використовувати для відбору мазків з носу дітям віком до 5 років велюр-тампони, а дітям старше 5 років – цитощітки.

Розроблено метод культивування та виділення HBoV1 в умовах *in vitro* з наступною молекулярно-генетичною ідентифікацією збудника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Голубовська О. А. Гострі респіраторні захворювання та грип: особливості сучасного перебігу, лікування та профілактика / О. А. Голубовська, А. В. Шкурба, А. М. Печінка // Україна. Здоров'я нації. – 2012. – №1 (21). – С. 129-140.
2. Маркович І. Г. Аналіз захворюваності за 2009-2013 роки / І. Г. Маркович, О. Й. Гриневич // Україна. Здоров'я нації. – 2013. - №2. (26). – С. 118-123.
3. Дзюблик І. В. Новий парвовірус людини та клінічні прояви захворювання, що він викликає / І. В. Дзюблик, О. В. Обертинська // Український хіміотерапевтичний журнал – 2010. – №1. – С. 27-30.
4. World Health Organization. Infection prevention and control of epidemic-and pandemic prone acute respiratory infections in health care. 25 april 2016. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.euro.who.int>.
5. Schildgen V. Human Metapneumovirus: Lessons Learned over the First Decade / V. Schildgen, B. Hoogen, R. Fouchier // Clin. Microbiol. Rev. – 2011. – № 24. (4). – P. 734-754.
6. Alimuddin Z. Middle East Respiratory Syndrome / Z. Alimuddin, D. S. Hui, S. Perlman // Lancet. – 2015. – Vol. 5. – №386. – P. 995–1007.
7. Jimenez-Guardeño J. M. Identification of the Mechanisms Causing Reversion to Virulence in an Attenuated SARS-HCoV for the Design of a Genetically Stable Vaccine / J. M. Jimenez-Guardeño, J. A. Regla-Nava, J. L. Nieto-Torres // PLoS Pathog. – 2015. – Vol. 29(10). – P. 1005215.
8. Sloots T. P. Evidence of human Coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children / T.P. Sloots, P. McErlean, D. J. Speicher // J. Clin. Virol. – 2006. – Vol. 35. – P. 99-102.
9. Allander T. Human bocavirus and acute wheezing in children / T. Allander, T. Jartti, S. Gupta // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 908.

10. Allander T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander, M. T. Tammi, M. Eriksson // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102. – P. 12895.
11. Guo L. Bocavirus in children with respiratory tract infections / L. Guo // *Emerg. Infect Dis.* – 2011. – Vol. 17 (19). – P. 1775-1777.
12. Cotmore S. F. The family Parvoviridae / S. F. Cotmore, M. Agbandje-McKenna, D. V. Mukha // *Arch. Virol.* – 2014. – Vol. 159. – P. 1239–1247.
13. Völz S. Prospective study of human bocavirus infection in a pediatric university hospital in Germany 2005-2006 / S. Völz, O. Schildgen, D. Klinkenberg // *J. Clin. Virol.* – 2007. – N 40. – P. 229–235.
14. Maggi F. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases / F. Maggi, E. Andreoli, M. Pifferi // *J. Clin. Virol.* – 2007. – Vol. 38. – P. 321–325.
15. Meriluoto M. Association of Human Bocavirus 1 infection with respiratory tract disease in childhood follow-up study, Finland / M. Meriluoto, L. Hedman, L. Taner // *Emerging Infectious Diseases.* – 2012. – Vol. 18. – P. 264–271. www.cdc.gov/eid.
16. Kesebir D. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus / D. Kesebir, M. Vazquez, C. Weibel // *J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 194(9). – P. 1276–1282.
17. Moriyama Y. Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years / Y. Moriyama, H. Hamada, M. Okada // *Eur. J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 169(9). – P. 1087–1092.
18. Chuang C. Y. Human bocavirus as an important cause of respiratory tract infection in Taiwanese children / C. Y. Chuang, C. L. Kao, L. M. Huang // *J. Microbiol. Immun. Inf.* – 2011. – Vol. 44. – P. 323–327.
19. Schildgen O. Human Bocavirus: Lessons Learned to Date / O. Schildgen // *Pathogens.* – 2013. – Vol. 2(1). – P. 3–12.

20. Deng Y. High Viral Load of Human Bocavirus Correlates with Duration of Wheezing in Children with Severe Lower Respiratory Tract Infection / Y. Deng, X. Gu, X. Zhao // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(3). – P. 34353.
21. Global strategy for asthma management and prevention (GINA 2015). Режим доступа: http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2011.pdf.
22. Kantola K. Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1-4 / K. Kantola, L. Hedman, J. Arthur // J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 1. – N 204(9). – P. 1403-1412.
23. Allander T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander, M. T. Tammi, M. Eriksson // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102. – P. 12891–12896.
24. Allander T. Human bocavirus and acute wheezing in children / T. Allander, T. Jartti, S. Gupta // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 904-910.
25. Vicente D. Human Bocavirus and Gastroenteritis / D. Vicente, G. Cilla, M. Montes, E. G. Pérez-Yarza, E. Pérez-Trallero // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13. – www.cdc.gov/eid.
26. Kapoor A. A newly identified bocavirus species in human stool / A. Kapoor, E. Slikas, P. Simmonds // J. Infect Dis. – 2009. – Vol. 199(2). – P. 5.
27. Kapoor A. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections / A. Kapoor, P. Simmonds, E. Slikas, L. Li, L. Bodhidatta, O. Sethabutr, H. Triki, O. Bahri, B. S. Oderinde // J Infect Dis. – 2010. – Vol. 201. – P. 1633-1643.
28. Arthur J. L. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children / J. L. Arthur, G. D. Higgins, G. P. Davidson // P. LoS Pathog. – 2009. – Vol. 5 (4). – P. 1000391.
29. Kapoor A. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections / A. Kapoor, P. Simmonds, E. Slikas, L. Li, L. Bodhidatta, O. Sethabutr, H. Triki, O. Bahri, B. S. Oderinde // J Infect Dis. – 2010. – Vol. 201. – P. 1-18.

30. Burns K. Parvoviridae / K. Burns, CR. Parrish // *Fields` Virology* – 2007. – P. 2437–2466.
31. Cotmore S. F. The family Parvoviridae / S. F. Cotmore, M. Agbandje-McKenna, D. V. Mukha // *Arch. Virol.* – 2014. – Vol. 159. – P. 1239–1247.
32. Urs T. Human Bocavirus as the Cause of a Life-Threatening Infection / T. Urs, A. Steyer, S. Kopriva, G. Kalan, U. Krivec, M. Petrovec // *J. of Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 1179–1181.
33. Brieu N. Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) / N. Brieu, B. Gay, M. Segondy // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45(10). – P.3419-20.
34. Brittney L. Human Bocavirus Capsid Structure: Insights into the Structural Repertoire of the Parvoviridae / L. Brittney // *J. Virol. Jun.* – 2010. – Vol. 84. – (12). – P. 5880–5889.
35. Kailasan S. Mapping antigenic epitopes on the Human Bocavirus capsid / S. Kailasan, J. Garison, M. Ilias // *Journal of Virology.* – 2016. – V. 90. – №9. – P. 4670-4680.
36. Volz S. Prospective study of Human Bocavirus (HBoV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006 / S. Volz, O. Schildgen, D. Klinkenberg, V. Ditt, A. Muller, R. L. Tillmann, B. Kupfer, U. Bode, M. J. Lentze, A. Simon // *J. Clin. Virol.* – 2007. – Vol. 40. – P. 229–235.
37. Xu L. Surveillance and Genome Analysis of Human Bocavirus in Patients with Respiratory Infection in Guangzhou, China / L. Xu, X. He, D. Zhang // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(9). – P. e44876.
38. Kapoor A. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections / A. Kapoor, P. Simmonds, E. Slikas, L. Li, L. Bodhidatta, O. Sethabutr, H. Triki, O. Bahri, B. S. Oderinde // *J Infect Dis.* – 2010. – Vol. 201. – P. 11.
39. Liu Q. Human Bocavirus NS1 and NS1-70 Proteins Inhibit TNF- α -Mediated Activation of NF- κ B by targeting p65 / Q. Liu, Z. Zhang, Z. Zheng, C. Zheng // [Электронный ресурс]. – режим доступа: [Sci Rep. 2016; 6: 28481](https://doi.org/10.1038/srep28481). Published online 2016 Jun 22. doi: 10.1038/srep28481.

40. Zou W. Nonstructural protein NP1 of human Bocavirus 1 plays a critical role in the expression of viral capsid protein / W. Zou, F. Cheng, W. Shen // *Virology Journal*. – 2016. – Vol. 90. – №9. – P. 4658-4669.
41. Shen W. Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1 / W. Shen, X. Deng, W. Zou, F. Cheng, J.F. Engelhardt, Z. Yan, J. Qiu // *J Virol*. 2015. - Oct Vol. 89(19): 10097–10109.
42. Wang X. Complete Genomes of Three Human Bocavirus Strains from Children with Gastroenteritis and Respiratory Tract Illnesses in Jiangsu, China / X. Wang, X. Zhang // *J. of Virol.* – 2012. – Vol. 86. – P. 13826-13827.
43. Xu L. Surveillance and Genome Analysis of Human Bocavirus in Patients with Respiratory Infection in Guangzhou, China / L. Xu, X. He, D. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(9). – P. 44876.
44. Zhou F. Porcine bocavirus: achievements in the past five years / F. Zhou, H. Sun, Y. Wang // *Viruses*. – 2014. – [Електронний ресурс]. – режим доступу: www.mdpi.com/journal/virus
45. Li B. Complete Genome Sequence of a Novel Species of Porcine Bocavirus, PBoV5 / B. Li, J. Ma, S. Xiao // [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://jvi.asm.org>.
46. Khalfaoui S. Lung infection by human bocavirus induces the release of profibrotic mediator cytokines in vivo and in vitro / S. Khalfaoui [et al.] // 2016. - [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [PLOS ONE/ DOI: 10.1371/journal.pone.0147010](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147010).
47. Дзюблик І. В. Новий парвовірус людини та клінічні прояви захворювання, що він викликає / І. В. Дзюблик, О. В. Обертинська // *Ж. Здоров'я суспільства*. – 2008. - №1. – С.94.
48. Дзюблик І. В. Новий парвовірус людини та клінічні прояви захворювання, що він викликає / І. В. Дзюблик, О. В. Обертинська // *Український хімотерапевтичний журнал* – 2010. – №1. – С. 27-30.

49. Кондратьева Т. Ю. Эпидемиологические особенности новой респираторной инфекции – бокавируса человека / Т. Ю. Кондратьева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. - №4. – 41. – С. 17-22 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.infection.-today.com.
50. Han T. H. Human Bocavirus 2 in Children, South Korea / T. H. Han, J. Y. Chung, E. S. Hwang // *Emerg. Infect. Dis.* 2009. – Vol. 15(10). P.1698–1700.
51. Chieochansin T. Absence of Detectable Replication of Human Bocavirus Species 2 in Respiratory Tract / T. Chieochansin, A. Kapoor, E. Delwart, Y. Poovorawan, P. Simmonds // *Emerg Infect Dis.* – 2009. – 15(9). – P.1503–1505.
52. Qiu J. The transcription profile of the bocavirus bovine parvovirus is unlike those of previously characterized parvoviruses / J. Qiu, F. Cheng, F. B. Johnson, // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81 (21). – P. 12080–12085.
53. Sun Y. Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses / Y. Sun // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83 (8). – P. 3956.
54. Chen A. Y. Bocavirus infection induces mitochondrion-mediated apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase / A. Y. Chen, Y. Luo, F. Cheng // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84 (11). – P. 5615–5620.
55. McKillen J. Isolation in cell cultures and initial characterisation of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland / J. McKillen, F. McNeilly, C. Duffy, M. McMenamy, I. McNair, B. Hjertner, A. Millar, K. McKay, P. Lagan, B. Adair, G. Allan *Veterinary Microbiology.* – 2011. - №152. – P. 39–45.
56. Dijkman R. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells / R. Dijkman, S. M. Koekkoek, R. Molenkamp // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(15). – P. 7739–7774.
57. Huang Q. Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia / Q. Huang, X. Deng, Z. Yan // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8(8). – P. 1002899.

58. Xuefeng D. In Vitro Modeling of Human Bocavirus 1 Infection of Polarized Primary Human Airway Epithelia / Y. Ziying // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.lvi.asm.org.
59. Shen W. Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1. / W. Shen, X. Deng, W. Zou, F. Cheng, J. F. Engelhardt, Z. Yan, J. Qiu // J Virol. – 2015. – Vol. 89. – P.10097–10109.
60. Bin S. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells / S. Bin, C. Yingyue, L. Jingjing // Journal Virology. – 2013. – Vol. 440. – P. 75–83. www.elsevier.com.
61. Dijkman R. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells / R. Dijkman, S. M. Koekkoek, R. Molenkamp // J. Virol. – 2009. – Vol. 83(15). – P. 7739–7774.
62. Kapoor A. Bocavirus Episome in Infected Human Tissue Contains Non-Identical Termini / A. Kapoor, M. Hornig, A. Asokan, B. Williams // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [28. doi: 10.1371/journal.pone.0021362](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021362)
63. Tamura K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. – 2011. – Vol. 28(10). – P.2731-9.
64. Kantola K. Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1–4 / K. Kantola, L. Hedman, J. Arthur, A. Alibeto, E. Delwart, T. Jartti, O. Ruuskanen, K. Hedman, M. Söderlund-Venermo // J Infect Dis. – 2011. – Vol. 204(9). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [1403-1412. doi: 10.1093/infdis/jir5](https://doi.org/10.1093/infdis/jir5).
65. Jian Jun W. U. Detection of human bocavirus in children with acute respiratory tract infections in Lanzhou and Nanjing, China / W. U. Jian Jun // Biomed Environ Sci. – 2014. – Vol. 27 (11). – P.841-848.
66. Völz S. Prospective study of human bocavirus infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006 / S. Völz, O. Schildgen, D. Klinkenberg // J. Clin. Virol. – 2007. – Vol. 40. – P. 229–235.

67. Körner R. W. Severe Human Bocavirus Infection, Germany / R. W. Körner, M. Söderlund-Venermo, S. van Koningsbruggen-Rietschel, R. Kaiser, M. Malecki, O. Schildgen // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – Vol. 17(12). – P.2303–2305.
68. Foulongne V. Human Bocavirus in French children / V. Foulongne, Y. Olejnik, V. Perez // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1251–1253.
69. Pierangeli A. Human bocavirus infection in hospitalized children in Italy / A. Pierangeli, C. Scagnolari, S. Trombetti, R. Grossi, M. Battaglia, C. Moretti, F. Midulla, G. Antonelli // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2008. – Sep. – Vol. 2(5). – P.175–179.
70. Söderlund-Venermo M. Clinical Assessment and Improved Diagnosis of Bocavirus-induced Wheezing in Children, Finland / M. Söderlund-Venermo, A. Lahtinen, T. Jartti, L. Hedman, K. Kemppainen, P. Lehtinen, T. Allander, O. Ruuskanen, K. Hedman // *Emerg. Infect. Dis.* - 2009. – Sep. – Vol. 15(9). – P.1423–1430.
71. Meriluoto M. Association of Human Bocavirus 1 Infection with Respiratory Disease in Childhood Follow-up Study, Finland / M. Meriluoto, L. Hedman, L. Tanner, V. Simell, M. Mäkinen, S. Simell, J. Mykkänen, J. Korpelainen, O. Ruuskanen, J. Ilonen, M. Knip, O. Simell, K. Hedman, M. Söderlund-Venermo // *Emerg Infect Dis.* – 2012. – Vol. 18(2). – P. 264–271.
72. Haidopoulou K. Human bocavirus infections in hospitalized Greek children / K. Haidopoulou, M. Goutaki, L. Damianidou, M. Eboriadou, A. Antoniadis, A. Papa // *Arch Med Sci.* – 2010. – Vol.1. 6(1). – P. 100–103.
73. Nawaz S. Human Bocaviruses Are Not Significantly Associated with Gastroenteritis: Results of Retesting Archive DNA from a Case Control Study in the UK / S. Nawaz, D. J. Allen, F. Aladin, C. Gallimore, M. Iturriza-Gómara // [Электронный ресурс]. - (doi: [10.1371/journal.pone.0041346](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041346)).
74. Kesebir D. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus / D. Kesebir, M. Vazquez, C. Weibel // *Infect. Dis.* –2006. – Vol. 194(9). – P. 1276–1282.

75. Blinkova O. Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States / O. Blinkova, K. Rosario, L. Li, A. Kapoor, B. Slikas, F. Bernardin, M. Breitbart, E. Delwart // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(11). – P.3507-3513.
76. Cecchini S. Evidence of Prior Exposure to Human Bocavirus as Determined by a Retrospective Serological Study of 404 Serum Samples from Adults in the United States / S. Cecchini, A. Negrete, T. Virag, B. S. Graham, J. I. Cohen, R. M. Kotin // *Clin Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16(5): 597–604.
77. Cecchini S. Evidence of prior exposure to human bocavirus as determined by a retrospective serological study of 404 serum samples from adults in the United States / S. Cecchini, A. Negrete, T. Virag // *Clin. Vaccine. Immunol.* – 2009. – Vol. 16(5). – P. 597–604.
78. Chow B. D. Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio / B. D. Chow, Y. T. Huang, F. P. Esper // *J. Clin. Virol.* – 2008. – Vol. 43 (3). – P. 302–306.
79. Bastien N. Detection of human bocavirus in Canadian children in 1-year study / N. Bastien, N. Chui, J. L. Robinson // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. - № 2. – P. 610–613.
80. Pechinka A. Acute respiratory infections: issues of clinical diagnosis and treatment / A. Pechinka // *Dzeman-Ukrainian Medical chasopys.* – 2010. – № 5.(79). – P. 9-10. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: online <http://www.moz.gov.ua>
81. Allander T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander // *Proc Natl Acad Sei U S A.* – 2005. –102(36). - P. 12896.
82. Arden K. E. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections / K. E Arden // *J Med Virol.* – 2006. –78(9). – P. 1232-40.

83. Sloots T. P. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children / T. P. Sloots, P. McErlean // *J Clin Virol.* – 2006. – Vol. 35(1). – P. 99-102.
84. Bonzel L. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction / L. Bonzel, T. Tenenbaum, H. Schrotten // *J Pediatr Infect Dis.* – 2008. – Vol. 27(7). – P. 589-594.
85. Smuts H. Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing / H. Smuts, L. Workman // *J Med Virol.* – 2008. – Vol. 80(5). – P. 906-12.
86. Hindiyeh M. Y. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israel children / M. Y. Hindiyeh, N. Keller // *J Clin Microbiol.* – 2008. – Vol. 46(1). – P. 334-7.
87. Arnold J. S. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital / J. S. Arnold, K. K. Sing, S. A. Spector // *Clin. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 43(3). – P. 283-8.
88. Arthur J. A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children / J. Arthur, G. D. Higgins, G. P. Davidson, R. C. Givney, R. M. Ratcliff // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5(4). – P. 1000391.
89. Sloots T.P. Evidence of human Coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children / T.P. Sloots, P. McErlean, DJ. Speicher // *J. Clin. Virol.* – 2006. – Vol. 35. – P. 99–102.
90. Kaplan N. M. Human Bocavirus Infection among Children, Jordan / N. M. Kaplan, W. Dove, A. F. Abu-Zeid, H. E. Shamoan, S. A. Abd-Eldayem, C. Anthony Hart // *Emerg Infect Dis.* - 2006. – Vol. 12(9). – P. 1418-1420.
91. Smuts H. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa / H. Smuts, D. Hardie // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1457–1458.
92. Smuts H. Human Bocavirus in Hospitalized Children, South Africa / H. Smuts, D. Hardie // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – Vol. 12(9). – P. 1457–1458.

93. Abdel-Moneim A. S. Detection of Bocavirus in Children Suffering from Acute Respiratory Tract Infections in Saudi Arabia / A. S. Abdel-Moneim, Mahmoud M. Kamel, Abdullhamid S. Al-Ghamdi, M. I. R. Al-Malky // *PLoS One*. - 2013. – Vol. 8(1). – P.55500.
94. Mori D. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010 / D. Mori, U. Ranawaka, K. Yamada, S. Rajindrajith, K. Miya, H. Kumara K. Perera, T. Matsumoto, M. Dassanayake, M. T. Mitui, H. Mori, A. Nishizono, M. Söderlund-Venermo, K. Ahmed // *Emerg Infect Dis*. – 2013. – Vol. 19(11). P. 1859-1862.
95. Blomström A. L. Genetic characterisation of a porcine bocavirus detected in domestic pigs in Uganda / A. L. Blomström, K. Ståhl, A. R. Okurut, C. Masembe, M. Berg // *Virus Genes*. – 2013. – Vol. 47(2). – P. 370–373.
96. Lau S. K. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong / S. K. Lau, C. C. Yip, T. L. Que // *J. Infect. Dis*. – 2007. – N 196(7). – P. 986–993.
97. Lin F. Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China / F. Lin, A. Zeng, N. Yang, H. Lin, E. Yang, S. Wang, D. Pintel, J. Qiu // *Infect Agent Cancer*. – 2007. – Vol. 2. P.3.
98. Qu X. W. Human Bocavirus Infection, People's Republic of China / X. W. Qu, Z. J. Duan, Z. Y. Qi, Z. P. Xie, H. C. Gao, W. P. Liu, C. P. Huang, F. W. Peng, L. S. Zheng // *Emerg Infect Dis*. – 2007. – Vol.13(1). – P.150–152.
99. Liu W. K. Detection of human bocavirus from children and adults with acute respiratory tract illness in Guangzhou, southern China / W. K. Liu, D. H. Chen, Q. Liu, H. X. Liang, Z. F. Yang, S. Qin, R. Zhou // *BMC Infect Dis*. – 2011. – Vol.11. P.345.
100. Xu L. Surveillance and Genome Analysis of Human Bocavirus in Patients with Respiratory Infection in Guangzhou, China / L. Xu, X. He, D. Zhang, F. Feng, Z. Wang, L. Guan, J. Wu, R. Zhou, B. Zheng, K. Yuen, M. Li, K. Cao // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(9). P.44876.

101. Guo L. Differential Seroprevalence of Human Bocavirus Species 1-4 in Beijing, China / L. Guo, Y. Wang, H. Zhou, C. Wu, J. Song, J. Li, G. Paranhos-Baccalà, G. Vernet, J. Wang, T. Hung // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(6). – P. 39644.
102. Wang X. Complete Genomes of Three Human Bocavirus Strains from Children with Gastroenteritis and Respiratory Tract Illnesses in Jiangsu, China / X. Wang, X. Zhang, H. Tian, F. Ling, M. Yu, G. Sun, S. Yang, Q. Shen, Y. Wang, S. Shao, W. Zhang // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86(24). – P. 13826–13827.
103. M I. P. Pediatric hospitalisation of acut respiratory tract infections with Human Bocavirus in Hong Kong / I. P. M, E. A. Cheuk // *J. Clin. Virol.* – 2008. – Vol. 42(1). – P.72-74.
104. Chung J. Y. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea / J. Y. Chung, T. H. Han, C. K. Kim, S. W. Kim // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12(8). – P. 1254–1256.
105. Endo R. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture of Japan / R. Endo, N. Ishiguro, H. Kikuta // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45(10). – P. 3218–3223.
106. Weissbrich B. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infactions / B. Weissbrich, F. Neske, J. Schubert // *BMC. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 6. – P.109.
107. Maggi F. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases / F. Maggi, E. Andreoli, E. Pifferi // *J. Clin. Virol.* – 2007. – Vol. 38(4). – P.321-5.
108. Monteny M. Human bocavirus in febrile children The Netherlands / M. Monteny, H.G. Niesters, H.A. Moll // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 13(1). – P.180-2.
109. Кондратьева Т. Ю. Бокавирус человека при ОРЗ / Т. Ю. Кондратьева, Е. Ю. Швец, С. Б. Яцишина // *Сб. Матер. Науч.-практ. Конф. «Этиология инфекционных болезней»*. – 2010. – P. 1. – С.21.

110. Вартанян Р.В. Клинико-лабораторная диагностика бокавирусной инфекции у детей / Р. В. Вартанян, Ю. В. Швецова, Е. И. Исаева, С. Б. Яцышина // Материалы 4-го Ежегю Всерос. Конгр. – 2012. – Т.1. – С. 80.
111. Кондратьева Т. Ю. Бокавирус человека – недавно открытый вирус, ассоциирующийся с острыми респираторными заболеваниями / Т. Ю. Кондратьева [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.infection-today.com.
112. Денисюк Н. Б. Использование ПЦР-диагностики для расшифровки этиологической структуры острых респираторных вирусных инфекций у детей / Н. Б. Денисюк, Ю. Д. Каган / Забайкальский медицинский журнал. – 2012. – Т.1. – С. 151-12.
113. Яцышина С. Б. Молекулярно-генетические методы в диагностике и эпидемиологическом надзоре за острыми респираторными инфекциями / С. Б. Яцышина, М. Н. Прадед // Молекулярная диагностика. – 2014. – Т.1 (10). – С.321-322.
114. Львов Н. И. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013–2014 гг. / Н. И. Львов, М. М. Писарева, О. В. Мальцев // Журнал Инфектологии. – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 62–70.
115. Шмелева Н. П. Этиология ОРИ у детей на современном этапе / Н. П. Шмелева, Н. В. Сивец, Е. Н. Сергиенко // Ж. Оригинальные научные публикации. – 2013. – Т. 5, № 6. – С. 129–131.
116. Сивец Н. В. Ассоциация респираторной патологии детей с бокавирусом / Н. В. Сивец, Н. П. Шмелёва, И. Г. Германенко, Н. В. Грибкова [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.docu-track.com.
117. Грибкова Н. В. Тяжелые острые респираторные инфекции в эпидемические сезоны по гриппу 2010–2013гг. в республике Беларусь / Н. В. Грибкова, Е. В. Чешенок, Н. В. Сивец [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.docu-track.com.

118. Сергиенко Е. Н. Острые респираторные вирусные инфекции у детей / Е. Н. Сергиенко, И. Г. Германенко [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.docu-track.com.
119. Козулина И. С. Бокавирусы в этиологии респираторных заболеваний у детей раннего и дошкольного возраста / И. С. Козулина, Г. А. Самсыгина, Е. И. Исаева // Дет. инф. – 2009. – № 11. – С. 81–85.
120. Kapoor A. A newly identified bocavirus species in human stool / A. Kapoor, E. Slikas, P. Simmonds // J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 205(1). – P.111-112.
121. Chow B. D. Evidence of human bocavirus circulation in children and adults, Cleveland, Ohio / B. D. Chow, Y. T. Huang, F. P. Esper // J. Clin. Virol. – 2008. – Vol. 43 (3). – P.302-6.
122. Kesebir D. Human Bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and characteristics of a newly emerging virus / D. Kesebir, M. Vazquez // J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 194 (9). – P. 1276–82.
123. Romani S. Detection of human Bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis / S. Romani, S. R. Mohebbi, M. Khanyaghma // Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench. – 2013. – № 6. – S. 77–81.
124. Arthur J. L. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children / J. L. Arthur, G. D. Higgins, G. P. Davidson // P. LoS Pathog. – 2009. – Vol. 5 (4). – P. 1000391.
125. Chung J.Y. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea / JY. Chung, TH. Hun, TH. Kim // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol.12 (8). – P.1255.
126. Choi E. H. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infection in Korean children, 2000-2005 / E. H. Choi, H. J. Lee, S. J. Kim // Clin. Infect. Dis. – 2006. – Vol.43(5). – P.585-92.
127. Albuquerque M. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brasil / M. Albuquerque, L. Rocha, F. Benati // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13. – P. 1756–1758.

128. Christensen A. Christensen A. Detection of spliced mRNA from human bocavirus 1 in clinical samples from children with respiratory tract infections / A. Christensen // *Emerging Infections Diseases*. – 2013. – Vol. 19. – (4). – P.574.
129. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus / A. Y. Chen, F. Cheng, S. Lou // *Virology*. – 2010. – Vol. 403. – P. 145–154.
130. Hindiyeh M. Y. High Rate of Human Bocavirus and Adenovirus Coinfection in Hospitalized Israel Children / M. Y. Hindiyeh, N. Keller, M. Mandelboim, D. Ram, J. Rubinov, L. Regev, V. Levy, S. Orzitzer, H. Shaharabani, R. Azar, E. Mendelson, Z. Grossman // *J Clin Microbiol*. – 2008. – Vol. 46(1). – P. 334–337.
131. Longtin J. Human Bocavirus Infections in Hospitalized Children and Adults / J. Longtin, M. Bastien, R. Gilca, E. Leblanc, G. de Serres, M. G. Bergeron, G. Boivin // *Emerg Infect Dis*. – 2008. – Vol.14(2). P.217-221.
132. Arnold J. C. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital / J. C. Arnold, K. K. Singh, S. A. Spector // *Clin. Infect. Dis*. – 2006. – Vol. 43. – P. 283–288.
133. Hindiyeh M. Y. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children / M. Y. Hindiyeh, N. Keller, M. Mandelboim // *J. Clin. Microbiol*. – 2008. – Vol. 46(1). – P. 334–337.
134. Linstov M. L. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants from a prospective birth cohort study / M. L. Linstov, M. Hong, B. Hong // *Pediatr. Infect. Dis*. – 2008. – Vol. 27(10). – P.897-902.
135. Longtin J. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults / J. Longtin, M. Bastien, R. Gilca // *Emerg. Infect. Dis*. – 2008. – Vol. 14. – P. 217–221.
136. Salmón-Mulanovich G. Frequency of human bocavirus (HBoV) infection among children with febrile respiratory symptoms in Argentina, Nicaragua and Peru / G. Salmón-Mulanovich, Merly Sovero, V. A. Laguna-Torres, T. J. Kochel, A. G. Lescano, G. Chauca, J. F. Sanchez, F. Rodriguez, E. Parrales, V.r Ocaña, M. Barrantes, D. L. Blazes, J. M. Montgomery // *Influenza Other Respir Viruses*. – 2011. – Vol. 5(1). P.1–5.

137. Garcia M. L. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children: a 2-year study / M. L. Garcia, C. Calvo, F. Pozo // Arch. Dis. Child. – 2009. – Vol. 94(3). – P.249.
138. Kaplan N. M. Human Bocavirus infection among children, Jordan / N.M. Kaplan, W. Dove // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12(9). – P. 1418-20.
139. Chung J. Y. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea / J. Y. Chung, T. H. Han, C. K. Kim, S. W. Kim // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12(8). – P. 1254–1256.
140. Maggi F. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases / F. Maggi, E. Andreoli, M. Pifferi // J. Clin. Virol. – 2007. – Vol. 38. – P. 321–325.
141. Teixeira de Sousa T. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil / T. Teixeira de Sousa, M. Souza, F. S. Fiaccadoril // J. Clin. Virol. – 2012. – Vol. 107(6). – P. 231–235.
142. Lee J. I. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenterites / J. I. Lee, J. Y. Chung, T. H. Han // J. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 196(7). – P. 994-7.
143. Cheng W. X. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study / W. X. Cheng, Y. Jin, Z. J. Duan // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 47(2). – P.161-7.
144. Yu J. M. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis in China / J. M. Yu, D. D. Li, Z. Q. Xu // J. Clin. Virol. – 2008. – Vol. 42(3). – P. 280-5.
145. Campe H. Human bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis / H. Campe, C. Hartberger, A. Sing // J. Clin. Virol. – 2008. – Vol. 43(3). – P. 340-2.
146. Schildren O. Human bocavirus and gastroenteritis / O. Schildren, A. Muller, A. Simon // Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13(10). – P.1620-1.
147. Christensen A. Detection of spliced mRNA from human bocavirus 1 in clinical samples from children with respiratory tract infections / A. Christensen // Emerging Infections Diseases. – 2013. – Vol. 19. (4). – P.575.

148. Lin F. Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China / F. Lin, A. Zeng, N. Yang // *Infect. Agent. Cancer.* - 2007. - Vol. 2. - P.3.
149. Hao R. Correlation between nucleotide mutation and viral loads of human bocavirus 1 in hospitalized children with respiratory tract infection / R. Hao, K. Ni // *Journal of General Virology* – 2013. – Vol. 94. – P. 1079-1080.
150. Gendrel D. Human bocavirus in children with acute asthma / D. Gendrel, R. Guedj, C. Catalano-Pons // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 45(3). – P.404-5.
151. Miyaki S. Absence of human Bocavirus in bronhoalveolar lavage fluid of lung transplant patients / S. Miyaki, J. Barratt // *J. Clin. Virol.* – 2009. – Vol. 44(2). – P.179-80.
152. Rugger C. M. Simultaneous atelectasis in human bocavirus infected monozygotic twins: was it plastic bronchitis? / [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.biomedcentral.com/1471-2431/13/209.
153. Tabasi M. Human bocavirus infections among children less than two years old in Iran during fall and winter 2012–2013 / M. Tabasi, T. T. Mokhtari-Azad, M.R. Eshraghian // *Iran. J. Microbiol.* – 2016. – Vol. 8(1). – P. 80–84.
154. Nunes M. C. Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children / M. C. Nunes, Z. Kuschner, Z. Rabede, R. Madimabe, N. Van Niekerk, Jackie Moloi, Locadiah Kuwanda, John W. Rossen, Keith P. Klugman, Peter V. Adrian, Shabir A. Madhi // *PLoS One.* – 2014. - Vol. 9(2). P. 86448.
155. Koskenvuo M. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia / M. Koskenvuo, M. Mottonen, M. Waris // *Eur. J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 167(9). – P.1011-5.
156. Garbino J. Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection / J. Garbino, S. Inoubli, E. Mossdorf // *AIDS.* – 2008. – Vol. 22(6). – P.701-5.

157. Bubshait D. K Clinical description of human bocavirus viremia in children with LRTI, Eastern Province, Saudi Arabia / D. K. Bubshait, W. H. Albuali // *Ann. Thorac. Med.* – 2015. – Vol. 10(2). – P.146–149.
158. Lin F. Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China / F. Lin, A. Zeng, N. Yang // *Infect. Agent. Cancer.* - 2007. – Vol. 2. - P.2.
159. Symekher S. M. L. Human Bocavirus Infection in Children with Acute Respiratory Infection in Nairobi, Kenya / [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2013.34035>.
160. Longtin J. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults / J. Longtin, M. Bastien, R. Gilca // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – №14. – P.217–221.
161. Вартамян Р. В. Клинико-лабораторная диагностика бокавирусной инфекции у детей / Р. В. Вартамян, Ю. В. Швецова, Е. И. Исаева, С. Б. Яцишина // *Материалы 4-го Ежегодного Всероссийского конгресса.* – 2012. – Т. 1. – С. 80.
162. Шмелева Н. П. Этиология ОРИ у детей на современном этапе / Н. П. Шмелева, Н. В. Сивец, Е. Н. Сергиенко // *Ж. Оригинальные научные публикации.* – 2013. – Т. 5, № 6. – С. 129–131.
163. Околишева Н. В. Бокавірус в структурі ГРВІ у дітей раннього віку інфікованих герпесвірусами / Н. В. Околишева, Л. Б. Кістенєва, А. Г. Боковий [та ін.] // *Зб. матеріалів науково-практичної конференції.* – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 81–82.
164. Hao R. Correlation between nucleotide mutation and viral loads of human bocavirus 1 in hospitalized children with respiratory tract infection / R. Hao, K. Ni, Q. Xia // *Journal of General Virology.* – 2013. – Vol. 94. – P. 1079–1085.
165. Gerna G. The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification / G. Gerna, A. Piralla, G. Campanini // *New Microbiol.* – 2007. – Vol. 30(4). – P.383-392.
166. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб: Навчально-методичний посібник для лікарів / І.В. Дзюблик. – 2012. – С.70-71.

167. Xu L. Surveillance and Genome Analysis of Human Bocavirus in Patients with Respiratory Infection in Guangzhou, China / L. Xu, X. He, D. Zhang // *Cao PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(9). – P. 44876.
168. Deng Y. High Viral Load of Human Bocavirus Correlates with Duration of Wheezing in Children with Severe Lower Respiratory Tract Infection / Y. Deng, X. Gu, X. Zhao // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(3). – P. 34353.
169. Schildgen V. The Human Bocavirus Is Associated with Some Lung and Colorectal Cancers and Persists in Solid Tumors / V. Schildgen, M. Malecki, R. Tillmann // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(6). – P. 68020.
170. Proenca-Modena J. L. Hypertrophic Adenoid Is a Major Infection Site of Human Bocavirus 1 / J. L. Proenca-Modena, F. E. Paula, G. P. Buzatto // *J. Clin. Microbiol.* – 2014, August. – N 52(8). – P. 3030–3037.
171. Salmón-Mulanovich G. Frequency of human bocavirus (HBoV) infection among children with febrile respiratory symptoms in Argentina, Nicaragua and Peru / G. Salmón-Mulanovich, M. Sovero, V. A. Laguna-Torres // *PMC.* – 2014. – Vol. 5(1). P. 3–5.
172. Tozer S. J. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR / S. J. Tozer, S. B. Lambert, D. M. Whiley, S. Bialasiewicz, M. J. Lyon, M. D. Nissen, T. P. Sloots // *J. Med. Virol.* – 2009. – Vol. 81(3). – P.488-93.
173. Gerna G. The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification / G. Gerna, A. Piralla, G. Campanini // *New Microbiol.* – 2007. – Vol. 30(4). – P.383-392.
174. Mugasa C. M. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with Oligochromatography for Detection of *Trypanosoma brucei* in Clinical Samples / C. M. Mugasa, T. Laurent, G. J. Schoone, P. A. Kager, G. W. Lubega, H. D. Schallig // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(3). P. 630–635.
175. Guido M. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges / M. Guido, M. R. Tumolo, T. Verri, A. Romano, F. Serio, M. De Giorgi, A. De Donno, F. Bagordo, A. Zizza // *J Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 21. 22(39). – P. 8684-8697.

176. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб: Навчально-методичний посібник для лікарів / І.В. Дзюблик. – 2012. – С.73.
177. Курильщикова А. М. Разработка мультиплексной ПЦР тест-системы для детекции Rotavirus С, Astrovirus, Bocavirus / А. М. Курильщикова, Е.В. Жираковская, А. Ю. Тикунов, Н. В. Тикунова // Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням. – Т. 2. – С. 168.
178. Жираковская Е. В. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у взрослых в Новосибирске / Е. В. Жираковская, А. Ю. Тикунов, А. М. Курильщикова // Инфекционные болезни. – 2013. – Т. 11. - № 2. – С. 31-37.
179. Daley P. Comparison of Flocked and Rayon Swabs for Collection of Respiratory Epithelial Cells from Uninfected Volunteers and Symptomatic Patients / P. Daley, S. Castriciano, M. Chernesky, M. Smieja // J. Clin. Microbiol. – 2006. – P. 2265-2267.
180. Li L. Comparison among nasopharyngeal swab, nasal wash, and oropharyngeal swab for respiratory virus detection in adults with acute pharyngitis / [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com>.
181. Meerhoff T. J. Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction / T. J. Meerhoff, M. L. Houben, F. E. J. Coenjaerts // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2010. – № 29. – P. 365–371.
182. Bruning A. H. L. Detection and monitoring of human bocavirus 1 infection by a new rapid antigen test / A. H. L. Bruning, P. Susi, H. Toivola, A. Christensen, M. Söderlund-Venermo, K. Hedman, H. Aatola, A. Zvirbliene, J.O. Koskinen // New Microb. New Infect. – 2016. – Vol. 11. P. 17–19.
183. Endo R. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture of Japan / R. Endo, N. Ishiguro, H. Kikuta // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45(10). – P. 3218–3223.

184. Kantola K. Serodiagnosis of human bocavirus infection / K. Kantola, L. Hedman, T. Allander // *J. Clin. Infect. Dis.* – 2008, Feb. – Vol. 15. - N 46(4). – P. 547–549.
185. Jartti T. Human bocavirus — the first 5 years / T. Jartti, K. Hedman, L. Jartti, O. Ruuskanen, T. Allander, M. Söderlund-Venermo // *Rev. Med. Virol.* – 2011. Код доступу: DOI: [10.1002/rmv.720](https://doi.org/10.1002/rmv.720).
186. Lin F. ELISAs using human Bcavirus VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HboV / F. Lin, W. Guan, F. Cheng // *J. Virol. Methods.* – 2008. – № 149(1). – P.110–117.
187. Deng Y. High Viral Load of Human Bocavirus Correlates with Duration of Wheezing in Children with Severe Lower Respiratory Tract Infection / Y. Deng, X. Gu, X. Zhao // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(3). P. 34353.
188. Lindner J. CD4⁺ T Helper Cell Responses against Human Bocavirus Viral Protein 2 Viruslike Particles in Healthy Adults / J. Lindner, S. Zehentmeier, R. Franssila [Електронний ресурс]. - <http://jid.oxfordjournals.org>.
189. Zaghoul M. Z. Human bocavirus (HBoV) in children with respiratory tract infection by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and qualitative polymerase chain reaction (PCR) / M. Z. Zaghoul // *Virol J.* - 2011. – Vol. 8. P.239.
190. Allander T. Human bocavirus and acute wheezing in children / T. Allander, T. Jartti, S. Gupta // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 44. – P. 904–910.
191. Культура клітин у медичній вірусології: Навчально-методичний посібник / І. В. Дзюблик, О. П. Трохименко, С. М. Соловійов. – Київ. - 2015. – С. 85–96.
192. Sanger F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F. Sanger, A. R. Coulson // *J. Mol. Biol.* – 1975. – Vol. 94. – P. 444-448.
193. Наказ МОЗ України № 662 від 30.07.2013 року «Про затвердження Методичних рекомендацій "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції»

- [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua>.
194. Наказ МОЗ України № 922 від 04.12.2009 року «Форма обліку матеріалу для дослідження, відібраного від пацієнта з тяжкою гострою респіраторною інфекцією (ТГРІ) в умовах стаціонару, яким було пронумеровано карту до якої вносилися вся необхідна інформація». [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua>.
195. Кондратьева Т. Ю. Бокавирус человека - недавно открытый вирус, ассоциирующийся с острыми респираторными заболеваниями / [Електронний ресурс] – режим доступу: www.epidemvac.ru/.../bokavirus-cheloveka-nedavno-otkrytyy-virus
196. Сивец Н. В. Ассоциация респираторной патологии детей с бокавирусом человека / [Електронний ресурс]. - Режим доступу <https://www.bsmu.by/files/cdb4f5189425ae4e1753292f99905403>
197. Харламова Ф. С. Метапневмовирусная и бокавирусная респираторные инфекции в структуре ОРВИ у детей / Ф. С. Харламова, О. В. Кладова, В. Ф. Учайкин, С. Г. Чешик, Р. В. Вартамян, К. П. Яблонская // Ж. Детские инфекции. – 2015. - №2. – С.6.
198. Hammitt L. L. Added Value of an Oropharyngeal Swab in Detection of Viruses in Children Hospitalized with Lower Respiratory Tract Infection / L. L. Hammitt, S. Kazungu, S. Welch / Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – Vol. 8. – P. 2318–2320.
199. Швидкі ІХА-тести для етіологічної діагностики інфекційних захворювань людини / І.В. Дзюблик // Методичні рекомендації. – Київ. - 2013. – С. 34–41.
200. Instruction by tests «Legionella Urinary Antigen Card The Alere Logo, Alere and BinaxNOW are trademarks of the Alere group of companies». All trademarks referenced are trademarks of their respective owners. © 2015 Alere. All rights reserved.
201. Instruction by tests «Streptococcus pneumoniae Antigen Card The Alere Logo, Alere and BinaxNOW are trademarks of the Alere group of companies». All

trademarks referenced are trademarks of their respective owners. © 2015 Alere.
All rights reserved.

202. Культура клітин у медичній вірусології. Навчально-методичний посібник / І. В. Дзюблик, О. П. Трохименко, С. М. Соловйов – Київ. - 2015. – С. 85–96.
203. Chan K. H. Comparison of nasopharyngeal flocced swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children / K. H. Chan, J. S. Peiris, W. Lim // *J. Clin. Virol.* – 2008. – Vol. 42. – P. 65–69.
204. Koseki N. Detection of Human Bocaviruses 1 to 4 from Nasopharyngeal Swab Samples Collected from Patients with Respiratory Tract Infections / N. Koseki, S. Teramoto // *Journal of clinical microbiology.* – 2012. –Vol. 50(6). – P.2118–21.
205. Dijkman R. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells / R. Dijkman, S. M. Koekkoek, R. Molenkamp // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(15). – P. 7774.
206. Huang Q. Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia / Q. Huang, X. Deng, Z. Yan // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8(8). – P. 1002899.
207. Xuefeng D. In Vitro Modeling of Human Bocavirus 1 Infection of Polarized Primary Human Airway Epithelia / Y. Ziying // [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.lvi.asm.org.
208. Дзюблик І. В. Культура клітин у медичній вірусології. Навчально-методичний посібник / І. В. Дзюблик, О. П. Трохименко, С. М. Соловйов – Київ. - 2015. – С. 85–96.
209. Медицинская вирусология / Д. К Львов // *Руководство.* – 2008. – С.29-42.
210. Misigo D. Molecular detection and phylogenetic analysis of Kenyan human bocavirus isolates / D. Misigo, D. Mwaengo, D. Mburu // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2014. – №8(2). – P. 221–227.

