

ЗМІСТ

I. КОРОТКИЙ ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕННЯ	4
1.1. Основні цілі:	4
1.2. Додаткові цілі:	4
II. ВСТУП	6
2.1. Огляд клінічного спектру захворювань, викликаних збудниками особливо небезпечних інфекцій (ОНІ)	6
2.2. Огляд періодів клінічного перебігу та характерних особливостей природноосередкових інфекцій	7
2.3. Сучасні знання про гарячки невідомого походження, пов'язаних з геморагіями, в Україні	9
2.4. Ретроспективний огляд клінічних та епідеміологічних ознак наявності ГНЧС серед населення України	11
2.5. Ретроспективний огляд відомостей про наявність ССНФV у кліщах та хантавірусів у гризунів в Україні 12	
2.6. Діагностичні підходи до виявлення ССНФV та хантавірусів	13
III. ПЛАН ДОСЛІДЖЕННЯ.....	14
3.1. Цілі	14
3.2. Загальна структура дослідження	16
3.3. Методика проведення дослідження.....	18
3.3.2. ОПИТУВАЛЬНИК	19
3.4. Припинення участі суб'єкта у дослідженні	22
3.5. Процедури на випадок відхилення від протоколу	23
IV. ВІЗИТИ ТА ПРОЦЕДУРИ В РАМКАХ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
4.1. Включення та скринінг суб'єктів дослідження	24
4.2. Визначення суб'єкта дослідження та надання компенсації	24
4.3. Довгострокове зберігання і подальше використання знеособлених зразків	24
4.4. Опитувальник.....	24
4.5. Статус результатів лабораторних досліджень	25
V. ЕТИЧНІ МІРКУВАННЯ	25
5.1. Інституційний або незалежний комітет з біоетики	25
5.2. Етичне проведення дослідження	25
5.3. Рутинні процедури з отримання інформованої згоди	25
VI. ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
6.1. Початок дослідження	26
6.2. Холодовий ланцюг для біологічних зразків	26
6.3. Завершення дослідження	26
6.4. Остаточний звіт / аналіз даних	27
6.5. Конфіденційність / безпека	27
6.6. Публікація результатів дослідження.....	27
6.7. Фінансування дослідницького проекту.....	27
VII. ОЦІНКА РИЗИКІВ	28
VIII. ПОВІДОМЛЕННЯ ПРО СЕРЬОЗНІ АБО НЕСПОДІВАНІ ПОБІЧНІ ЯВИЩА ТА НЕПЕРЕДБАЧЕНІ ПРОБЛЕМИ	28
IX. ПІДПИС ДОСЛІДНИКА	28
X. СПИСОК ДЖЕРЕЛ:.....	29

Протокол дослідження

Назва проекту:	UP-8: Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки (вірус ККГГ) і хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференційної діагностики у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз
Номер протоколу:	Буде визначено пізніше
Головний дослідник (ГД):	Сергій Моргун, Начальник санітарно-епідеміологічного управління командування Медичних сил Збройних Сил України вул. Госпітальна, 16, Київ, Україна тел. +38 (063) 817- 42 - 88 email: general4ik1811@gmail.com
Співдослідники від лабораторій в Україні:	Ігор Цибровський, Начальник лабораторного відділу, лікар-бактеріолог, 10 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Київ, вул. Госпітальна, 16 тел. +38 0632852828 email: sibrik@i.ua Ірина Шевчук, Начальник лабораторії особливо небезпечних інфекцій лабораторного відділу 28 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Львів, вул. Зелена, 45 тел. +38 (067) 302-61-13 email: 19071976ira@ukr.net Владислав Петренко, Начальник 108 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Харків, пл. Феєрбаха, 12 тел. +38 (067) 104-44-13 email: vapdok@ua.fm Оксана Мариніченко, Начальник лабораторного відділу 27 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Одеса, вул. Старопортофранківська, 48 тел. +38 (093) 785-47-50 email: marinich1305@ukr.net

Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки (вірус ККГГ) і хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференційної діагностики у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз

Спеціаліст зі збору медичних даних / менеджер даних в Україні: Микола Олим, к.мед.н., лікар-епідеміолог, начальник епідеміологічного відділу – заступник санітарно-епідеміологічного управління командування Медичних сил Збройних Сил України вул. Госпітальна, 16, Київ, Україна
тел. +38 (095) 896-96-62
email: olymskiy@ukr.net

Лабораторії: Лабораторія особливо небезпечних інфекцій 10-го регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Київ, вул. Госпітальна, 16

Лабораторія особливо небезпечних інфекцій 28-го Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Львів, вул. Зелена, 45

Бактеріологічна лабораторія 108 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Харків, пл. Фесрбаха, 12

Лабораторія особливо небезпечних інфекцій 27-го Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, м. Одеса, вул. Старопортофранківська, 48

Комісія з біоетики ДУ ЦГЗ МОЗ України
Пр. Степана Бандери, 19
Київ 04071, Україна
Посадова особа з правом підпису: Ігор Кузін
Телефон: + 38 (050) 398-2134
Факс: + 38 (050) 398-2134
Email: i.kuzin@ukraids.gov.ua
Федеральний гарантійний сертифікат (FWA)
FWA00026980

Заява про відповідність: Дослідження буде проводитися відповідно до протоколу і згідно із дотриманням етико-правових норм та вимог до проведення наукових досліджень за участю людей, встановленими в Україні, а також згідно з усіма міжнародними нормами, включаючи принципи конфіденційності та недоторканності приватного життя.

I. КОРОТКИЙ ОГЛЯД ДОСЛІДЖЕННЯ

Наразі нагляд у сфері громадської охорони здоров'я в Україні є головним чином пасивним та ґрунтується на звітності, яку надають медичні заклади. Є підозра, що наявна інформація про інфекційні захворювання є неповною у зв'язку з низьким рівнем користування послугами охорони здоров'я та відносною недостатністю можливостей високоякісної лабораторної діагностики, у тому числі, відсутністю можливостей для діагностики Крим-Конго геморагічної гарячки (ККГГ) та хантавірусних інфекцій. Майже у третини з 276 пацієнтів з клінічним діагнозом «лептоспіроз» в одній із львівських лікарень на момент виписки зі стаціонару або смерті були відсутні антитіла до лептоспір за результатами дослідження у реакції мікроскопічної аглютинації (МАТ). Крім того, смертність була значно вищою серед серонегативних хворих порівняно з тими, у яких діагноз підтверджено шляхом МАТ (15% проти 5%, $p < 0,01$) [1]. Ці результати вказують на можливість того, що у деяких серонегативних пацієнтів з клінічним діагнозом «лептоспірозу», включаючи смертельні випадки, могли бути наявними інші серйозні інфекції. Ми припускаємо, що до таких інфекцій може відноситися геморагічна гарячка з нирковим синдромом (ГГНС) або Крим-Конго геморагічна гарячка (ККГГ) внаслідок інфікування, відповідно, хантавірусами або вірусом ККГГ. Для перевірки даної гіпотези ми пропонуємо провести проспективне дослідження з мінімальним ризиком із залученням пацієнтів, госпіталізованих з підозрою або підтвердженим діагнозом «лептоспіроз» або гарячковим захворюванням невстановленої етіології.

1.1. Основні цілі:

1. Визначити серопревалентність антитіл до хантавірусів і вірусу ККГГ серед здорових добровольців, залучених установами військових частин та медичних закладів Міністерства оборони України (МО України), розташованих у Львові, Харкові, Одесі та Києві, і порівняти ці дані з інформацією у їх медичних картках, а також із місцезнаходженням установи.
2. Ідентифікувати віруси ККГГ та хантавіруси у сироватках крові людей використовуючи цільовий підхід до вибірки зразків добровольців.
3. Створити базу даних, яка включатиме всі результати представлені у вигляді аналізу. Зібрані дані будуть аналізуватися щоквартально з постійним поповненням/доопрацюванням бази даних протягом проекту.

1.2. Додаткові цілі:

1. Створити можливості точного введення даних скринінгових досліджень в спеціалізовані програми та їх аналізу для дослідників в закладах МО України.

Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки (вірус ККГГ) і хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференційної діагностики у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз

СКОРОЧЕННЯ

AE	Несприятлива подія
BTRP (ПЗБЗ)	Програма зменшення біологічної загрози (ПЗБЗ)
BVSPC (БВСПК)	Блек енд Вітч Спешиал Проджекс Корп. (БВСПК)
C	За шкалою Цельсія
CCHF (ККГГ)	Крим-Конго геморагічна гарячка
CCHFV	Вірус Крим-Конго геморагічної гарячки
CFR	Кодекс федеральних правил
CITI	Програма спільного інституційного навчання
CRF (ІРФ)	Індивідуальна реєстраційна форма
CSED (ЦСЕУ)	Центральне санітарно-епідеміологічне управління
CV	Біографічна довідка
DOBV	Вірус Добрава
DTRA (A33)	Агентство зменшення загрози
EDI (ОHI)	Особливо небезпечна інфекція
ELISA	Імуноферментний аналіз
FWA	Федеральний гарантійний сертифікат
HFRS (ГГНС)	Геморагічна гарячка з нирковим синдромом
HRP	Пероксидаза хрону
HRPO	Відділ з питань захисту людей як суб'єктів досліджень
ICD	Документ про інформовану згоду
IFA	Імунофлуоресцентний аналіз / метод флуоресціюючих антитіл (МФА)
IgG	Імуноглобулін G
IgM	Імуноглобулін M
IRB	Комісія з питань етики
MAT	Реакція мікроаглютинації
мл	Мілілітр
MoD (МО України)	Міністерство оборони України
MoH (МОЗ)	Міністерство охорони здоров'я України
PCR (ПЛР)	Полімеразна ланцюгова реакція
PHC (ЦГЗ)	Центр громадського здоров'я
PI	Головний дослідник
PUUV	Вірус Пуумала
RIEN (НДІЕГ)	Науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького
RSED (РСЕУ)	Регіональне санітарно-епідеміологічне управління
SIN	Номер суб'єкта дослідження
SI PHC MoH (ДУ ЦГЗ МОЗ)	Державна установа «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України»
SOP (СОП)	Стандартна операційна процедура

II. ВСТУП

2.1. Огляд клінічного спектру захворювань, викликаних збудниками особливо небезпечних інфекцій (ОНІ)

Багато з особливо небезпечних інфекцій (ОНІ) важко діагностувати клінічно через низький рівень захворюваності, рідкісні спалахи, неспецифічні симптоми та клінічні ознаки, особливо на початку захворювання. У цьому документі ми зосереджуємося на розробці стратегії диференційної діагностики інфекцій, викликаних ССНФV, DOBV, PUUV та *Leptospira* spp. Відповідно до узагальнених даних, представлених у **Таблиці 1**, для кожного з цих захворювань характерним є гарячковий продромальний стан, що триває декілька днів і часто супроводжується яскраво вираженою міалгією, головним болем, нудотою, блюванням, діареєю та болем у животі [1-6].

Таблиця 1. Загальні клінічні симптоми, пов'язані з інфекціями людини, спричиненими ССНФV, DOBV, PUUV або *Leptospira* spp.

Клінічні симптоми	Часто зустрічаються у пацієнтів з вірусними інфекціями, спричиненими вірусами:				
	<i>Добрава-Белград</i>	<i>Добрава-Куркіно*</i>	<i>PUUV</i>	<i>ССНФV</i>	<i>Leptospira</i> spp.
Головний біль	√	√	√	√	√
Біль у спині	√	√	√	√	√
Біль у животі	√	√	√	√	√
Нудота	√	√	√	√	√
Блювання	√	√	√	√	√
Петехії	√	√	√ (рідко)	√	√
Запаморочення	√	√	√	√	√
Олігурія	√	√	√		√
Геморагія (в кон'юнктиву, шкіру, слизові оболонки)	√			√	√
Внутрішня кровотеча	√			√	√ (легенева кровотеча)
Гарячка	√	√	√	√ (дуже висока)	√
Задишка					√
Тахікардія	√			√	√
Фотофобія				√	

Відсутність симптомів у верхніх та нижніх дихальних шляхах, а також відсутність легеневих інфільтратів на початку захворювання допомагає диференціювати ці ОНІ від поширених захворювань верхніх та нижніх дихальних шляхів, таких як грип або бактеріальна пневмонія. Однак клінічні прояви на ранніх стадіях гарячкового продромального періоду легко сплутати з самолімітуючими вірусними захворюваннями (наприклад, вірусним гастроентеритом), бактеріємією, бактеріальним гастроентеритом та колітом, генералізованою формою туляремії, бруцельозом, Ку-гарячкою, епідемічним висипний тиф та інфекції черевної порожнини. Отже,

загальний алгоритм клінічної діагностики повинен виокремити захворювання з-поміж великої кількості більш поширених інфекцій та включити лабораторні критерії, що зустрічаються достатньо часто. У процесі розвитку захворювання, спричиненого ОНІ, зміна симптомів, клінічних проявів та результатів рутинних лабораторних досліджень можуть надати додаткову діагностичну інформацію (Таблиця 2).

Таблиця 2. Розповсюджені лабораторні знахідки, пов'язані з інфекціями людини, спричиненими CCHFV, DOBV, PUUV або *Leptospira spp.*

Результати клінічних / лабораторних досліджень	Часто зустрічаються у пацієнтів з вірусними інфекціями, спричиненими:				
	<i>Добрава-Белград</i>	<i>Добрава-Куркіно</i>	<i>PUUV</i>	<i>CCHFV</i>	<i>Leptospira spp.</i>
Тромбоцитопенія	√	√	√	√	√
Підвищений рівень сечовини, креатиніну	√	√			
Лейкоцитоз	√	√		√	√
Протеїнурія	√	√	√		
Гематурія	√			√	
Гіпотензія	√	√		√	√
Підвищена проникність судин	√	√	√	√	
Гепатит				√	√
Поліурія	√	√	√		√
Гепатомегалія					√
Лімфаденопатія					
Анемія					√ (помірна)
Ознаки шоку	√			√	

2.2. Огляд періодів клінічного перебігу та характерних особливостей природноосередкових інфекцій

CCHFV передається через укуси кліщів або контакт з кров'ю кліщів / інфікованими тканинами людини / тварини [3]. Існує чотири періоди захворювання:

1. Інкубаційний (приблизно 3-6 днів, залежно від шлях передачі)
2. Прегеморагічний (раптовий початок)
3. Геморагічний (3-6 днів після початку захворювання)
4. Період реконвалесценції (15-20 днів після появи симптомів).

Летальність, що спостерігається у випадках ККГГ, перевищує летальність від інфекцій, спричинених найбільш вірулентним DOBV, і сягає близько 30-50% [3]. Після інкубаційного періоду тривалістю 3-6 днів раптово починається передгеморагічний період, для якого характерні такі неспецифічні симптоми як висока температура, біль у м'язах, головний біль, нудота та біль у животі. Геморагічний період, який починається приблизно на 3-6 день після початку захворювання, супроводжується петехіями та, у важких випадках, крововиливами великих розмірів у шкіру та слизові оболонки. Також може спостерігатись шлункова і

вагінальна кровотечею та кровотеча з ясен. У хворих з клінічними проявами часто відмічаються симптоми гепатиту від помірнього до важкого ступенів. До інших симптомів відносяться гепатомегалія та лімфаденопатія. Крім того, реєструвалися випадки крововиливу у головний мозок [7]. Летальності у випадках внутрішньолікарняного зараження є вищою ніж у випадках інфікування через укуси кліщів, хоча причини цього явища невідомі. Період реконвалесценції починається приблизно на 15-20 день після початку симптомів захворювання, пацієнти часто мають такі ускладнення як головний біль, нудота та запаморочення разом із загальною слабкістю та зниженням апетиту [3].

Існує три генотипи DOBV, що викликають захворювання у людей: Белград, Куркіно і Сочі [9-13]. У той час як їх клінічні прояви у людини є схожими між собою, однією з основних відмінностей між штамами Добрава-Белград та Добрава-Куркіно є їх вірулентність, а отже відрізняються й ступінь важкості перебігу захворювання та показник летальності у інфікованих пацієнтів. Обидва штами викликають ГГНС, що супроводжується сукупністю симптомів з п'ятьма періодами перебігу, які наступують після початкового інкубаційного періоду тривалістю 2-4 тижні. Розрізняють наступні періоди перебігу ГГНС:

1. Гарячковий (триває 3-7 днів)
2. Гіпотензивний (від декількох годин до 2 днів)
3. Олігуричний (3-7 днів)
4. Поліуричний (1-2 тижні)
5. Період реконвалесценції (3-6 тижнів)

Летальність від захворювання, спричиненого генотипом Добрава-Куркіно, варіюється в діапазоні 0,3-0,9%, в той час як Добрава-Белград є більш вірулентним, і рівень летальності від викликаного ним захворювання сягає 10% (коливається у межах 5-15%) або більше [12]. Насправді виявляється, що тяжкість клінічного перебігу та рівень летальності від захворювання, викликаного DOBV у людини, тісно пов'язані із генотипом вірусу. Питання молекулярної основи вірулентності різних підвидів залишається відкритим.

PUUV викликає легкі форми ГГНС, відомі під назвою епідемічна нефропатія [5, 13]. Епідемічна нефропатія характеризується тріадою симптомів: підвищена температура тіла, біль у животі та / або спині та / або головний біль, ознаки ураження нирок. Оскільки початкові симптоми з'являються раптово і часто мають гостру форму (підвищена температура тіла, озноб, блювання, головний біль та біль у животі), то далі захворювання перебігає зазвичай у легкій або самолімітуючій формі [13].

Лептоспіроз – інфекційне захворювання, спричинене бактеріями роду *Leptospira*. Клінічні прояви захворювання значно відрізняються: від субклінічного перебігу до летальних випадків. Значна кількість випадків, особливо в ендемічних регіонах, має субклінічний або легкий перебіг, а отже залишається невиявленими [14]. Типовий клінічний перебіг захворювання включає наступні стадії: інкубаційний період (2-10 днів), септицемічна стадія (4-7 днів), проміжна стадія (симптоми тимчасово зникають, 1-3 дні) та імунна стадія (0-30 днів). На початку захворювання симптоми з'являються раптово: підвищена температура тіла, головний біль, біль у м'язах, нудота, а також у деяких пацієнтів – жовтяниця. Імунна стадія може супроводжуватись повторним підвищенням температури тіла та менінгітом [6]. У складних

випадках можуть спостерігатися гостра ниркова недостатність і геморагічні прояви, а в одному системному огляді зазначалося, що летальність від лептоспірозу варіюється в межах 11-74% [6].

Враховуючи те, що: (1) інфекції, викликані *Leptospira* spp., ССНФV та хантавірусамі, мають багато спільних клінічних проявів; (2) у певних регіонах України, зокрема в Закарпатській області, спостерігається високий рівень летальності від лептоспірозу (понад 20% у 2014 році); а також (3) відсутність повних епідеміологічних даних про ситуацію з ССНФV та хантавірусами в Україні, ймовірно, що показники захворюваності та смертності від інфекцій, викликаних цими збудниками, в Україні є заниженими.

2.3. Сучасні знання про гарячки невідомого походження, пов'язаних з геморагіями, в Україні

В Україні зареєстровано випадки гарячок невідомого походження, асоційованими з геморагічним синдромом, включаючи захворюваннями з геморагічними проявами та нирковою недостатністю, про що зазначено в **Таблиці 3**. Дані, представлені в **Таблиці 3**, були взяті зі щорічних статистичних звітів, що подаються до МОЗ України, та були надані Юрієм Новохатнім, доктором Ігорем Небогаткіним (ЦГЗ) та доктором Іриною Демчишиною, завідуючою вірусологічною референс-лабораторією ЦГЗ.

У зв'язку із нестачею фінансової підтримки та основних діагностичних ресурсів, лабораторії МОЗ України на даний момент не в змозі проводити діагностику ССНФV та хантавірусів у випадках гарячок невідомого походження. Наприклад, доктор Ірина Демчишина зазначила, що її лабораторія отримує 20-50 клінічних зразків щороку від пацієнтів, у яких було діагностовано гарячку невідомого походження, але через відсутність діагностичних реагентів ЦГЗ не може дослідити ці зразки на ССНФV або хантавіруси. Українські дослідники регулярно звітують про циркуляцію ССНФV та хантавірусів в різних регіонах України на різних місцевих конференціях та в опублікованих працях. Однак досі не проводиться систематичне дослідження і немає актуальної інформації щодо розповсюженості та циркуляції збудників цих ОНІ в Україні. Висока смертність від лептоспірозу, підозра на циркуляцію вірусів, що викликають геморагічні стани, та клінічні прояви у пацієнтів, що вказують на недиагностовані віруси геморагічної гарячки, викликають занепокоєння щодо наявності інфекцій, викликаних ССНФV і хантавірусами, серед населення України.

Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки (вірус ККГГ) і хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференційної діагностики у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз

Таблиця 3. Захворюваність на гарячки з геморагічними проявами в Україні (2003-2017 рр.)

Гарячки невідомого походження			У тому числі ГГНС				
Рік	К-сть випадків	Область	Рік	К-сть випадків	Область	Метод підтвердження діагнозу	Установа
2003	1	Харківська область	2003	1	Харківська область	ELISA	ХНМУ
2004	6	Харківська область (1) Закарпатська область (5)	2004	6	Закарпатська область (5) Харківська область (1)	IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького ХНМУ
2005	6	Харківська область (2) Закарпатська область (3) Івано-франківська область (1)	2005	3*	Закарпатська область (2) Івано-франківська область (1)	IgM ELISA IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2006	1	Запорізька область	2006	1	Закарпатська область	IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2007	3	Закарпатська область (2) Львівська область (1)	2007	3	Закарпатська область (2) Львівська область (1)	IgM ELISA IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2008	16	Закарпатська область (2) Запорізька область (12) Львівська область (1) Херсонська область (1)	2008	1	Закарпатська область	IgM, IgG ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2009	11	Запорізька область	2009	0			
2010	8	Харківська область (1) Донецька область (7)	2010	0			
2011	12	Запорізька область (5) Донецька область (3) Миколаївська область (2) Полтавська область (1) Луганська область (1)	2011	0			
2012	33	Запорізька область (10) Донецька область (6) Полтавська область (15) Сумська область (2)	2012	2	Сумська область	Клінічний випадок	СОЛЦ
2013	5	Полтавська область (3) Закарпатська область (1) Житомирська область (1)	2013	1	Закарпатська область	IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2014	7	Вінницька область (1) Запорізька область (3) Київська область (1) Миколаївська область (1) Полтавська область (1)	2014	1	Київська область	IgM ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2015	12	Київська область (4) Полтавська область (3) Харківська область (3) Херсонська область (1) Запорізька область (1)	2015	4	Київська область	IgM, IgG ELISA	ЛНМУ ім. Данила Галицького
2016	6	Закарпатська область (1)	2016	5	Закарпатська		ЦГЗ

Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки (вірус ККГГ) і хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференційної діагностики у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз

Гарячки невідомого походження			У тому числі ГГНС				
Рік	К-сть випадків	Область	Рік	К-сть випадків	Область	Метод підтвердження діагнозу	Установа
		Київська область (3) Полтавська область (1) Місто Київ (1)			область (1) Київська область (3) Місто Київ (1)	ІдМ, ІgG ІФА, ІФА та імуноблот	
2017	14	Дніпропетровська область (1) Київська область (1) Полтавська область (3) Місто Київ (9)	2017	3	Київська область (1) Місто Київ (2)	ІдМ, ІgG ІФА, ІФА та імуноблот	ЦГЗ

* - всі 3 пацієнти померли. Скорочення: ХНМУ — Харківський національний медичний університет; ЛНМУ ім. Данила Галицького — Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького; СОЛЦ — ДУ «Сумський обласний лабораторний центр МОЗ України»; ЦГЗ — Центр громадського здоров'я МОЗ України

2.4. Ретроспективний огляд клінічних та епідеміологічних ознак наявності ГГНС серед населення України

В Україні клінічні та епідеміологічні ознаки наявності ГГНС були вперше зареєстровані в 1948 році. Випадок був описаний як «закарпатська гарячка» [15]. У 1985 році понад 50 випадків були зареєстровані в Івано-Франківській області і лабораторно підтверджені в НДІЕГ. Дані щодо ГГНС в Закарпатській області були опубліковані доктором Ольгою Маркович, завідувачкою лабораторії особливо небезпечних інфекцій Закарпатського обласного лабораторного центру (ОЛЦ) МОЗ України [16]. Варто зазначити, що за період 1948-2016 рр. в Закарпатській області було зареєстровано 197 випадків ГГНС (Таблиця 4).

Таблиця 4. Випадки ГГНС, зареєстровані в Закарпатській області

Рік	К-сть випадків
1948-1969	174
1976	2
2001	7
2004	5
2005	3
2007	2
2008	2
2013	1
2016	1
Всього за 68 років:	197

Перша спроба провести систематичний огляд досліджень хантавірусів в Україні була опублікована у кандидатській дисертації Людмили Козак [17]. Доктор Козак та ін. виявили специфічні антитіла до вірусу Хантаан у обстежених пацієнтів. Проте ці результати потребують уточнення, зокрема підтвердження видів та специфічних штамів, з огляду на наявність перехресної реакції при виявленні SEOV, HTNV та DOBV методами, які використовувалися. Крім того, присутність вірусу Хантаан в Україні не очікується. Точні послідовності вірусного геному патогенів, що циркулюють в Україні, все ще належить визначити.

2.5. Ретроспективний огляд відомостей про наявність ССНФV у кліщах та хантавірусів у гризунів в Україні

2.5.1. ССНФV

Основним переносником ССНФV є іксодові кліщі, а саме вид *Hyalomma*, що є основним джерелом розповсюдження вірусу в природі [18]. Саме тому епідеміологія ССНФV пов'язана з географічним розповсюдженням кліщів *Hyalomma* spp. Філогенетичний аналіз сегментів геному короткої РНК показує, що ССНФV можуть бути поділені на сім філогенетичних гілок: Африканська гілка 1, що включає ізоляти з Сенегалу; Африканська гілка 2, що включає ізоляти з Уганди та декілька з Південної Африки; Африканська гілка 3 – ізоляти з південної та західної Африки; Європейська гілка 1, що містить ізоляти з Росії, Туреччини та Балканського регіону; Європейська гілка 2, що містить один ізолят з Греції, AP92; Азіатська гілка 1 з ізолятами з Близького Сходу, Пакистану, Ірану; та Азіатська гілка 2 – з Китаю, Узбекистану та Казахстану. ССНФV циркулює в ензоотичному циклі «кліщ – хребетна тварина – кліщ», і хоча велика кількість домашніх та диких тварин може заразитися цим вірусом, доказів того, що вірус викликає в них захворювання, немає [19, 20].

Хоча систематичні моніторингові дослідження з метою виявлення ССНФV в Україні не проводились, існує ймовірність, що вірус широко розповсюджений на території південних областей України. Антиген ССНФV був виявлений в іксодових кліщах у декількох областях України, у тому числі Закарпатській і Львівській (21). Також антиген ССНФV було знайдено у кліщів *Dermacentor marginatus* на сході України у регіонах, розташованих поблизу добре відомих осередків у Ростовській та Поволзьких областях Росії.

2.5.2. Хантавіруси

Специфічні види та штами хантавірусів (порядок *Bunyavirales*, родина *Hantaviridae*) та гризунів, що є їх резервуарами в Україні, залишаються поки невідомими. Цілоком ймовірно, що в Україні циркулює більше ніж один вид хантавірусів. На даний момент у всьому світі було виявлено щонайменше 24 різні види хантавірусів у гризунів, зокрема було підтверджено, що хантавіруси можна виявити у різних видів землерийок / кротових, гризунів та кажанів. У багатьох літературних джерелах зазначається, що HTNV зустрічається в *Apodemus agrarius* на сході Уральських гір, в Китаї та Кореї, в той час як в Європі було виявлено, що вірус DOBV, переносниками якого є миша польова (*Apodemus agrarius*) та миша жовтогорла (*A. flavicollis*), став причиною ГГНС в Німеччині, Франції, Сербії, Хорватії, Словенії, Боснії та Герцеговині, Угорщині, Греції, Литві, Чеській Республіці, Естонії та Албанії [22-29]. В Європі PUUV викликає менш важкі форми ГГНС, які деколи називають епідемічною нефропатією. Основним переносником PUUV є полівка руда (*Myodes glareolus*, раніше відома як *Clethrionomys glareolus*) [30].

PUUV та DOBV є видами, що найбільш ймовірно циркулюють в регіоні, але можуть бути наявними й інші види. Ми припускаємо, що вірус Добрава-Куркіно може бути тим присутнім в зразках від гризунів, попередньо відібраних у Волинській області (в рамках проекту UP-2), де проводився моніторинг. Проте для отримання підтвердження

потрібно дочекатись результатів секвенування. Конкретні види вірусів, виявлені методом IFA або RT-qPCR, визначаються шляхом секвенування.

2.6. Діагностичні підходи до виявлення ССНФV та хантавірусів

2.6.1. Підходи до діагностики ССНФV.

Як і у хантавіруси, ССНФV містить три негативні одноланцюгові РНК-сегменти: короткий (S), середній (M) та довгий (L), в яких закодовано структурні білки: нуклеопротеїн (N), оболонкові глікопротеїни (Gn та Gc), а також протеїн L, або вірусна РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp), відповідно. Антигени, отримані шляхом експресії генів, що кодують білки N, Gn та Gc, можуть бути використані для ELISA. Крім ELISA, серологічний діагноз найчастіше визначається за допомогою IFA. IFA має вищу специфічність (100%) та чутливість до IgG та IgM, ніж ELISA. Як IFA, так й ELISA під час виявлення IgM можуть показати неспецифічну фонову реактивність, отже, для підтвердження діагнозу необхідно досліджувати зразки, отримані від пацієнтів, шляхом визначення IgG, нейтралізуючої активності або методом RT-qPCR. Вірус-специфічні антитіла IgG і IgM визначаються методом IFA приблизно через сім днів після початку хвороби, а IgG може виявлятися упродовж декількох років у осіб, що перенесли захворювання [31, 32]. Однак імунна відповідь рідко виявляється у летальних випадках, отже для дослідження пацієнтів потрібно застосовувати як IFA / ELISA, так і RT-qPCR.

2.6.2. Підходи до діагностики хантавірусів.

Перший молекулярний аналіз вірусу Хантаан (HTNV), проведений Schmaljohn та ін., показав, що геном містить три негативні одноланцюгові негативні сегменти РНК, які мають спільні 3' та 5'-термінальні нуклеотидні послідовності [33]. Як і у ССНФV, ці три сегменти геному (S, M, та L) кодують білки N, Gn та Gc, а також L (RdRp), відповідно [34]. Методи молекулярної діагностики зазвичай спрямовані на виявлення коротких сегментів (S), але важливо також брати до уваги і середні сегменти (M), оскільки може відбуватися реасортація вірусів.

Виявлення хантавірус-специфічних антитіл класу IgM у сироватці є найбільш поширеним методом серодіагностики ГГНС, оскільки на початку розвитку симптомів практично всі зразки сироваток, відібраних від пацієнтів з гострою формою ГГНС, містять антитіла класу IgM до глікопротеїнів та протеїну. У сучасних діагностичних тестах все більше використовуються рекомбінантні антигени, що експресуються у клітинах та виділяються у клітинних сумішах. Білки N, Gn та Gc є основними антигенами хантавірусів, що використовуються у серологічних дослідженнях. Усі ці три структурні білки можуть стимулювати виробку вірус-специфічних антитіл класу IgM у високих титрах, які можна виявити, з появою перших симптомів [35-38]. Рекомбінантні вірусні білки були протестовані в якості частково очищених антигенів для ELISA, вестерн-блоту або тест-смужок, що мають різний рівень специфічності та чутливості. З огляду на потенційну неспецифічну фонову реактивність в IFA та ELISA, паралельно із серологічними дослідженнями проводяться додаткові тести, зокрема виявлення IgG, реакція нейтралізації або RT-qPCR.

2.6.3. Підходи до діагностики лептоспірозу.

Лабораторно гострий лептоспіроз людини може бути діагностовано за допомогою ПЛР та серологічних досліджень, зокрема ELISA та реакції мікроаглютинації (МАТ) [14, 39]. Однак антитіла до лептоспір рідко виявляються методом МАТ у перші сім днів перебігу захворювання, а чутливість залишається значно нижчою від 100%, особливо протягом перших 14 днів хвороби [39]. Нещодавно було розроблено метод на основі ПЛР для виявлення ДНК лептоспір в сечі, що дозволяє діагностувати інфекцію в зразках, отриманих на ранньому етапі перебігу хвороби до того, як з'являється можливість виявляти антитіла. Як МАТ, так і ПЛР є доступними в Україні, і попередні дані зі Львова свідчать про те, що лептоспіроз можливо підтвердити за допомогою ПЛР, МАТ або обох методів приблизно у 85% пацієнтів з клінічним діагнозом гострого лептоспірозу (Зубач О., особисте спілкування).

III. ПЛАН ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Цілі

3.1.1. Основні цілі:

1. Визначити серопревалентність антитіл до хантавірусів серед 4000 і вірусу ККГГ серед 400 здорових добровольців, залучених установами військових частин та медичних закладів Міністерства оборони України, розташованих у Львові, Харкові, Одесі та Києві, і порівняти ці дані з інформацією у їх медичних картках, розроблених анкетах.

Захворювання, викликані хантавірусами, були вперше виявлені під час Кореїської війни, коли близько 1500 військовослужбовців ООН захворіли на невідому фібрильну хворобу з ознаками ураження нирок та геморагічними симптомами. Як показали результати досліджень за період багатьох років, військова діяльність (риття окопів, земельні роботи в полі) призводять до вищого ризику для солдатів, ніж будь-які інші види діяльності. Таким чином, ця популяція може пролити світло на поширеність хантавірусів у навколишньому середовищі та потенціал виникнення захворювання, оскільки Міноборони має військові частини на всій території країни. Окрім того, збір зразків МОЗ локалізований у двох областях з метою забезпечення інформативних оціночних даних про інтенсивність захворювання; у той же час, за результатами діяльності Міноборони будуть отримані оціночні дані щодо рівня ризику інфікування збудниками ККГГ та ГГНС в Україні. Ці дані також дадуть відповідь на запитання про те, чи екстраполяція даних про гризунів та кліщів на національний рівень може надати цінну цільову інформацію.

2. Ідентифікувати антитіла до вірусу ККГГ та хантавірусів у сироватках крові людей використовуючи цільовий підхід до вибірки зразків добровольців.

В межах другої цілі українські учасники використовуватимуть декілька діагностичних тестів для скринінгу сироваток крові людини на наявність антитіл до хантавірусів та вірусу ККГГ.

Сироватки крові, відібрані від людей, будуть перевірені на наявність антитіл до хантавірусів за допомогою методу IFA (експериментальні діагностичні тести, які були апробовані в Україні під час першого року проекту), а на наявність антитіл до вірусу ККГГ - за допомогою комерційного набору ELISA. Для скринінгу на наявність антитіл до хантавірусів будуть використані два різних скельця для IFA. Один для видів вірусу DOBV, а інший – для PUUV.

Таблиця 5. Орієнтовна кількість зразків та діагностичних тестів

Досліджуваний патоген	Метод діагностичного дослідження	Тип зразку	Місце проведення дослідження	Орієнтовна кількість зразків / тестів	Примітки
CCHFV	ELISA (комерційна тест-система)	Знеособлені зразки від здорових волонтерів	Лабораторія МО України М. Київ	400 (800 тестів)	Дві лунки на зразок від пацієнта
DOBV	IFA	Знеособлені зразки від здорових волонтерів	Лабораторія МО України М. Київ	4000 (600 скельце)	8 зразків на скельце (скринінг) 1 позитивний зразок на скельце (титр)
PUUV	IFA	Знеособлені зразки від здорових волонтерів	Лабораторія МО України М. Київ	4000 (600 скельце)	8 зразків на скельце (скринінг) 1 позитивний зразок на скельце (титр)

При дослідженні зразків сироваток крові, відібраних від здорових людей (добровольців), тільки зразки з позитивним титром 1:10 будуть перевірені у двократних розведеннях. Зразки будуть досліджуватися на дубльованих скельцях.

Зразки будуть досліджуватися за україномовними СОП та робочими протоколами, розробленими для цього аналізу. Позитивні зразки крові, в яких методом МФА (IFA) будуть виявлені антитіла до досліджуваного вірусу, будуть знешкоджені (DoD521089) шляхом знищення будь-якого потенційно живого вірусу у розчині TRizol.

3. Створити базу даних, яка включатиме всі результати представлені у вигляді аналізу. Зібрані дані будуть аналізуватися щоквартально з постійним поповненням/доопрацюванням бази даних протягом проекту.

3.1.2. Додаткові цілі

1. Створити можливості для дослідників в закладах ЦСЕУ МО України правильно вводити дані скринінгових досліджень в спеціалізовані електронні програми та проводити аналіз даних.

3.2. Загальна структура дослідження

3.2.1. Місця проведення дослідження

Це дослідження представляє собою вибіркове серологічне обстеження, щоб вивчити поширеність хантавірусів і вірусу ККГГ серед добровольців, що перебувають на службі МО України. Відбір матеріалу буде проводитися на базі військових частин та медичних закладів Міністерства оборони України, розташованих у Львові, Харкові, Одесі та Києві (в зонах відповідальності регіональних санітарно-епідеміологічних управлінь, перерахованих вище в розділі «Лабораторії-учасниці», Рис. 1) із залученням представників регіональних управлінь (перелічені вище в розділі «Співдослідники від лабораторій України»). Санітарно-епідеміологічне управління буде контролювати виконання протокольних процедур, включаючи збір зразків на місцях, лабораторне тестування, організацію збереження і обробки даних, і вважатиметься головним місцем проведення дослідження.

Дослідження на виявлення антитіл до хантавірусів методом IFA та до вірусу ККГГ методом ELISA будуть проводитися в лабораторії ОНІ 10-го Регіонального санітарно-епідемічного управління Міністерства оборони України в м. Києві (зазначено вище в розділі «Лабораторії-учасниці»). Лабораторії ОНІ 28-го, 108-го та 27-го Регіональних санітарно-епідемічних управлінь Міністерства оборони України також будуть проводити окремі аналізи з виявлення антитіл до хантавірусів методом IFA.

У кожній лабораторії та у Центральному санітарно-епідеміологічному управлінні МО України буде принаймні один лікар, який: 1) пройшов онлайн-навчання щодо етичного залучення людей як суб'єктів дослідження в рамках Програми спільного інституційного навчання (Collaborative Institutional Training Initiative – CITI) англійською або російською мовою в рамках договору UNMHSC про підготовку в рамках CITI, а також пройшов підготовку з питань протоколу дослідження. Після завершення навчання та отримання повного схвалення Комітету з етики будуть здійснені візити на місця відбору біологічного матеріалу від людей задля перегляду процедур в рамках протоколу і забезпечення зберігання записів, що стосуються дослідження в захищеному архіві.

Спеціаліст зі збору медичних даних / менеджер даних в Україні відвідає кожний заклад Служби превентивної медицини МОУ. України, де будуть відбиратися проби від добровольців, щоб переконатися, що суб'єкти дослідження відповідають критеріям включення та виключення і що підписані інформовані згоди та інші документи зберігаються у захищеному архіві. Кожному суб'єкту дослідження буде присвоєно унікальний ідентифікаційний номер, а зразки сироваток крові будуть маркуватись тільки унікальним номером учасника дослідження. Будь-яке посилення на особисті ідентифікатори буде зберігатися в захищеному архіві в кожному місці дослідження, доступному тільки для місцевого клінічного персоналу цього дослідження.

Рисунок 1. Карта областей України



3.2.2. Відбір досліджуваної групи

Досліджувана група буде складатися з дорослих осіб віком 18 років і старше, які відносяться до групи здорового населення з числа осіб, що вступають до Лав Збройних сил України вперше, проходять службу в теперішній час (у тому числі в зоні проведення ООС) та/або які повернулися з зони проведення Операції об'єднаних Сил. Усі особи, що підлягають обстеженню на ГГНС та ККГГ є здатними підписати інформовану згоду. Потенційні учасники будуть визначені представниками групи з відбору зразків Служби превентивної медицини МО в регіонах. Участь у дослідженні є добровільною і не вплине на надання медичної допомоги учаснику.

3.2.3. Розмір вибірки

Вибіркові зразки будуть отримуватися від здорових добровольців, яке будуть поступати в місця проведення дослідження для здачі крові або лікування неінфекційних хвороб. Визначено розмір вибірки добровольців, що підлягатимуть лабораторному обстеженню на виявлення антитіл до збудників ГГНС та ККГГ, що становить 4000 зразків сироваток крові – по 1000 зразків у кожній з перелічених вище областей (Рис. 1, Таблиця 5). У тому числі, на ККГГ буде досліджено 400 зразків сироваток крові (по 100 зразків з кожної зазначеної на Рис. 1 території); На ГГНС – 4000 зразків сироваток (по 1000 зразків з кожної зазначеної території).

3.3. Методика проведення дослідження

3.3.1. Залучення добровольців.

Суб'єкти дослідження будуть визначені шляхом аналізу амбулаторних карт та/або розроблених анкет або за рішенням відповідального лікаря з групи відбору зразків Служби превентивної медицини МО України. Потенційні суб'єкти дослідження будуть оцінюватися лише на основі критеріїв включення / виключення та наявної медичної інформації. Представники дослідницької групи на місці збору даних будуть оцінювати волонтерів з точки зору їх відповідності критеріям проведення дослідження. Якщо вони відповідатимуть останнім, то потенційному волонтеру запропонують участь у дослідженні. Відбір зразків крові здійснюватиметься підготовленим персоналом під час включення пацієнта до дослідження.

Участь у цьому дослідженні буде добровільною, і особи, які приймуть рішення взяти участь у ньому, зможуть залишити його у будь-який час. Участь у дослідженні жодним чином не вплине на військовий статус суб'єкта дослідження, доступ до медичних послуг, пільги, пов'язані з його роботою, або будь-які інші пільги, на які він має право. Крім того, результати дослідження не зберігатимуться у звичайній медичній картці суб'єкта дослідження, чия конфіденційність буде максимально захищена. Науковці, які проводитимуть це дослідження, не повідомлятимуть нікому всередині або за межами українського військового корпусу про результати аналізу крові та опитування, за якими можна встановити особу суб'єкта дослідження.

Ніхто зі старших і молодших офіцерів, а також прапорщиків і сержантів не впливатиме на рішення своїх підлеглих щодо їхньої участі у дослідженні та не буде присутній під час їх включення до дослідження. Старшим офіцерам буде надана можливість взяти участь у дослідженні і вони включатимуться до нього окремо від своїх підлеглих.

Критерії включення

1. Вік ≥ 18 років.
2. Добровольці, що відносяться до групи здорового населення з числа осіб, що вступають до Лав Збройних сил України вперше, проходять службу в теперішній час (у тому числі в зоні проведення ООС) та/або які повернулися з зони проведення Операції об'єднаних Сил.
3. Готовність брати участь у дослідженні і можливість надати письмову інформовану згоду.

Критерії виключення

1. Вік < 18 років.
2. Особи з ослабленим імунітетом, у тому числі за наявності ВІЛ-інфекції або активного злоякісного новоутворення, наприклад, лімфоми або лейкемії.

3. Особи, що мають медичні протипоказання.
4. Головний дослідник або персонал дослідження вважають, що включення в дослідження суперечить інтересам потенційного добровольця.

3.3.2. Опитувальник

Член дослідницької групи проведе бесіду з учасником дослідження і запропонує заповнити стандартний опитувальник (анкету). Опитування буде проводитися дослідницькою групою. За допомогою цієї анкети будуть зібрані відомості про демографічні дані, історію клінічних симптомів, що відповідатимуть клінічному перебігу досліджуваних хвороб, епідеміологічні фактори ризику, способи підтримання здоров'я. Співробітники, які проводять дослідження, організують заповнення опитувальника у відокремленій зоні. В опитувальник не будуть вноситись дані, за допомогою яких можна ідентифікувати особу учасника дослідження.

3.3.3. Лабораторні зразки

Кров буде відбиратися спеціально підготовленим медичним персоналом на момент включення добровольця до групи суб'єктів дослідження. Представник дослідницької групи збиратиме максимум 7 мл крові у добровольця. Якщо доброволець є донором крові, тоді взірець буде взято з наданої ним крові. Якщо доброволець є пацієнтом лікарні, то зразок буде взято шприцем з вени. Венозна кров буде отримана з лівої або правої поверхневої вени передпліччя, в одну пробірку без додавання будь-яких антикоагулянтів для відокремлення сироватки у кількості не більше 3 мл. Як тільки взірець буде отримано, сироватка буде відокремлена на місці, і всі взірці будуть зберігатися при температурі 2-4 градуси за Цельсієм у відповідній лабораторії МО України. Взірці будуть передаватися до лабораторії 10-го Регіонального санітарно-епідеміологічного управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України для обробки щонайменше один раз на тиждень. Зразки сироваток крові будуть отримані від кожного добровольця, включеного до протоколу дослідження.

3.3.4. Підготовка та зберігання зразків для дослідження

Зразки для діагностичних досліджень на хантавіруси та ССНФV будуть знеособлені і промарковані із зазначенням місця, дати відбору зразка та унікального номера, присвоєного суб'єкту дослідження. Зразок крові буде центрифуговано для отримання сироватки (збір та зберігання за температури -80°C). Зразки сироваток (по 3 аліквоти) будуть зберігатися в лабораторії ОНІ 10 РСЕУ за температури -80°C до початку та після проведення досліджень. Одна аліквота буде використана безпосередньо в лабораторії де будуть проводитися дослідження.

Зразки сироваток досліджують після осадження еритроцитів (центрифугування). Відокремлення сироватки від еритроцитів здійснюють таким чином: пробірку із зразком крові поміщають в термостат на 30 хв. при температурі 37°C для швидкого формування фібринового згустку (фібриноген, який не потрапив у згусток, може стати джерелом хибно-позитивних реакцій в деяких тест-системах), після чого обводять згусток від стінок пробірки стерильною пастерівською піпеткою і на 1 год. ставлять у холодильник при температурі $2-8^{\circ}\text{C}$. Зразки центрифугують 10 хв. при 3.000 об/хв. Збирають сироватку. Таку сироватку можна зберігати 72 год. у холодильнику при $2-8^{\circ}\text{C}$.

Якщо проби сироваток чи плазми не вдасться проаналізувати протягом терміну, вказаного вище, її буде заморожено при мінус 20 °С або при мінус 80 °С для тривалого (більше року) зберігання матеріалу (при цьому не слід допускати повторного заморожування та розморожування проб). Розморожені сироватки, які потребують повторного аналізу, не заморожуватимуться знову.

Усі зразки сироваток крові будуть поділені на 3 аліквоти (рівні частини), заморожені та зберігатимуться при температурі мінус 80 °С.

Зразки сироваток мають бути прозорі, без ознак гемолізу, вираженої гіперліпідемії (хільозу), бактеріемії. Не слід проводити серологічні дослідження (IFA/ELISA) пробам сироваток, де видно згустки крові, а також із сироватками, куди додано азид натрію (інгібітор пероксидази).

Необхідно виключити можливість потрапляння навіть мікрокількостей однієї проби до іншої, що часто трапляється при маніпуляціях з сироваткою над штативом з пробірками та над робочим планшетом; для кожної проби слід використовувати окремий наконечник для автоматичної піпетки.

Слід уважно ставитися до маркування зразків, щоб уникнути помилок.

3.3.5. Лабораторна діагностика

Сироватка, отримана від людей, буде досліджена на наявність антитіл (АТ) до хантавірусів за допомогою методу IFA (сукупні антитіла IgG та IgM), а до ССНФV - за допомогою комерційного набору ELISA. Для проведення скринінгу на наявність АТ до хантавірусів методом IFA необхідні два різні предметні скельця (слайди). Одне скельце буде використане для скринінгу на антитіла з перехресною реакцією до вірусів DOBV та SEOV, а друге використовуватиметься для скринінгу на антитіла до PUUV. Основні дослідження на виявлення АТ до хантавірусів будуть проводитися на базі лабораторії Служби превентивної медицини МО України у м. Києві. Лабораторії, що розташовані в Одесі, Харкові, Львові також будуть проводити окремі аналізи на виявлення АТ до хантавірусів.

Тестування на антитіла IgG до вірусу ККГГ за допомогою комерційних тест-систем для ELISA буде виконано на базі лабораторії особливо небезпечних інфекцій 10-го регіонального санітарно-епідемічного управління МО України із використанням зразків, що будуть відібрані в Одесі, Харкові, Києві та Львові.

Якщо в зразках, відібраних в учасника дослідження, буде виявлено специфічні антитіла до хантавірусів або ССНФV, для цих учасників буде проведено додаткове дослідження з розведенням сироваток.

Діагностичні скельця на виявлення антитіл до хантавірусів будуть використовуватися таким чином, що на одному скельці буде досліджено 8 зразків від людини з одним негативним і одним позитивним контролем або 10 зразків. Перший скринінг зразків крові проводиться у розведенні 1:10 у фосфатно-буферному розчині. Антитіла, які

зв'язуються з вірусним антигеном, виявляються за рахунок кон'югації вторинних антитіл з флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) або подібним флуорофором. Кожна лунка на діагностичному скельці може бути негативною (-), підозрілою (-/+), слабо (+) або виражено позитивною (+++), що визначається за перевіркою скелець на кількість FITC-позитивного фарбування в цитоплазмі кожної клітини. Позитивні зразки потім досліджуються у двократних розведеннях від 1:32 до 1:4096.

Дослідження на виявлення антитіла IgG до вірусу ККГГ будуть проведені згідно з інструкцією виробника. Принцип реакції полягає в тому, що в ELISA застосовується 96-лунковий планшет попередньо покритий цільовим антигеном. В реакції застосовуються комерційні позитивний та негативний контролю, що входять до складу комплексу реагентів для ELISA. Контролі або дослідні зразки додають до відповідних лунок і інкубують. Вільні компоненти промивають промивним буфером. Кон'югований детекторний реагент - пероксидаза хрому (HRP) використовується для візуалізації ферментативної реакції. Субстратний реагент ТМВ каталізує HRP і утворюється продукт окислення синього кольору, який змінюється на жовтий після додавання кислотного стоп-розчину. Інтенсивність жовтого кольору пропорційна кількості АТ IgG до збудника ССНФ, зв'язаної на дні лунки планшета. Оптичну густину (ОГ) поглинання вимірюють спектрофотометрично при 450 нм в пристрої для зчитування мікропланшетів.

Досліджувані сироватки будуть тестуватися в двох повторах. Буде застосовано аліквоту об'ємом 50 мкл попередньо розведеної 1:5 цільної сироватки.

3.3.6. Група лабораторних фахівців

Ігор Цибровський, Начальник лабораторного відділу 10 Регіонального відділу, санітарно-епідеміологічного управління, м. Київ
вул. Госпітальна, 16, Київ, Україна
тел. +38 0632852828
email: cibrik@i.ua

Ірина Шевчук, Начальник лабораторії особливо небезпечних інфекцій лабораторного відділу 28 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління м. Львів
тел. +38 (067) 302-61-13
email: 19071976ira@ukr.net

Оксана Мариніченко, Начальник лабораторного відділу 27 Регіонального санітарно-епідеміологічного управління м. Одеса
тел. +38 (093) 785-47-50
email: marinich1305@ukr.net

3.3.7. Управління даними

Буде створено базу електронну базу даних з використанням програмного забезпечення, що є доступними для цього дослідження на безоплатній основі. На місці відбору біологічного матеріалу заповнюватимуться паперові анкети. Анкетні дані будуть вводитися у Центральному санітарно-епідеміологічне управління Служби превентивної медицини Міністерства оборони України. Створення бази даних будуть проводити дві особи, а первинна анкета буде використовуватися для виправлення розбіжностей в записах. В подальшому двадцять відсотків паперових анкет будуть порівняні із записами для додаткового внутрішнього контролю якості. Паперові анкети, документи про свідоме погодження та реєстраційні форми будуть зберігатися у зачиненій шафі, і до них матимуть доступ лише дослідники та персонал, відповідальний за введення інформації. Персональні ідентифікатори не будуть зберігатися в жодній з електронних форм. До неї матимуть доступ лише дослідники та персонал, відповідальний за введення інформації.

Лабораторні дані будуть введені в формат excel для внесення інформації в статистичне програмне забезпечення, що буде вибрана для подальшого використання і аналізу. Інформація буде надана епідеміологу Служби превентивної медицини Міністерства оборони України, а після завершення дослідження фінальний звіт буде представлений МОЗ України.

3.3.8. План аналізу даних

Описові статистичні дані будуть включати кількість осіб з виявленими антитілами до збудників ККГГ та хантавірусної інфекції, поширеність за регіонами, опис симптомів (за можливості, ретроспективно за результатами опрацьованих анкет), демографічні показники, клінічні дані (симптоми, результати лабораторних досліджень, результати радіологічних досліджень). Статистичне програмне забезпечення включатиме вбудовані статистичні функції Resonance Patient Center, SAS, R або інші. Розробка алгоритму для прогнозування типу інфекції на основі демографічної та клінічної інформації буде проводитися з використанням змінних, які значно відрізняються у зв'язку із типом інфекції, а також будуть розраховані коефіцієнти ймовірності для розробки Байєсівського алгоритму.

3.4. Припинення участі суб'єкта у дослідженні

Участь суб'єктів у дослідженні може бути припинена з наступних причин:

- Суб'єкт дослідження добровільно відмовляється від участі (відкликає згоду).
- Дослідник або відповідальний лікар вважає, що в інтересах здоров'я добровольця йому слід вийти з дослідження.
- Було встановлено, що учасника було включено до дослідження з порушенням критеріїв включення / виключення.
- Суб'єкт дослідження не дотримується процедур, викладених в інформованій згоді.

- Дослідження припиняє Міністерство оборони США, інша регуляторна структура уряду США або будь-який регуляторний орган в Україні.

Якщо учасник вирішує відмовитися від участі в дослідженні або виходить із нього, будь-які зібрані в ході дослідження дані, включаючи зразки для лабораторних досліджень, будуть вилучені з аналізу та знищені.

3.5. Процедури на випадок відхилення від протоколу

Весь медичний персонал, що проводить відбір зразків крові та персонал лабораторій Служби превентивної медицини МО України, який бере участь у лабораторних процесах, до початку дослідження проходить навчання з процедур та етики проведення досліджень, суб'єктом якого є людина. У разі ненавмисного включення осіб, що не відповідають критеріям включення, біологічні зразки від них не повинні відбиратися, будь-які зібрані мають бути вилучені з аналізу та знищені, а особа має бути проінформовано про це. Якщо зразки для лабораторних досліджень від осіб, що не відповідають критеріям включення, вже були відібрані, вони будуть вилучені, а особа – проінформована про це.

У цілому, про відхилення від протоколу, що не впливають на здоров'я учасників, буде повідомлено під час поточного перегляду протоколу та/або в остаточному звіті. Про відхилення від протоколу або неочікувані ситуації, що можуть вплинути на здоров'я, безпеку або благополуччя учасників дослідження, буде негайно повідомлено головному досліднику / менеджеру зі збору даних, українському комітету з біоетики та Агентству зменшення загрози Міністерства оборони США (А33). Про незначні інциденти слід повідомляти протягом 72 годин, а про серйозні, включаючи випадки смерті – протягом 24 годин. Усі випадки смерті суб'єктів дослідження, підозрювані або відомі як такі, що пов'язані з процедурами дослідження, повинні бути доведені до відома комітетів із біоетики в США та Україні. Про будь-які відхилення від протоколу або неочікувані ситуації, які викликають занепокоєння щодо наукової обґрунтованості продовження дослідження, також буде негайно повідомлено головному досліднику, головному співдосліднику, українському комітету з біоетики та А33.

Якщо очікується відхилення від протоколу, головний дослідник та головний співдослідник попередять комітет з біоетики в Україні, а також заздалегідь запросять дозвіл на виняток з протоколу у А33. Усі зміни в протоколі та згоді повинні бути схвалені комітетами з біоетики в Україні до початку їх впровадження.

IV. ВІЗИТИ ТА ПРОЦЕДУРИ В РАМКАХ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Включення та скринінг суб'єктів дослідження

До потенційних суб'єктів дослідження звернеться член дослідницької групи в день включення до дослідження. Потенційним суб'єктам дослідження буде нагадано, що участь в дослідженні є повністю добровільною і згода або відмова від участі жодним чином не впливе на отримання медичне обслуговування або послуг у сфері громадського здоров'я, що надаються суб'єкту в даний час або надаватимуться в майбутньому; відсутність адміністративного тиску гарантована.

Інформовану згоду буде отримано до початку будь-якого втручання, передбаченого протоколом. Копія згоди буде надана суб'єкту дослідження після її підписання та вказання дати. Суб'єкт буде включений до дослідження після того, як буде визначено, що він / вона відповідає всім критеріям включення і не відповідає жодному з критеріїв виключення.

4.2. Визначення суб'єкта дослідження та надання компенсації

Суб'єкту дослідження присвоюється ідентифікаційний номер суб'єкта дослідження (SIN). SIN являє собою шестизначне число. Перші дві цифри ідентифікують місце проведення дослідження (один з лабораторних підрозділів). Останні чотири цифри визначатимуть суб'єкта дослідження, залученого у цьому місці (лабораторія), починаючи з 0001. Суб'єкти дослідження не отримуватимуть жодної плати, і їх участь буде виключно добровільною. Для всіх учасників передбачене безкоштовне медичне обстеження.

4.3. Довгострокове зберігання і подальше використання знеособлених зразків

Знеособлені біологічні зразки будуть зберігатися в морозильній камері за температури -80⁰С в лабораторії 10 РСЕУ у Києві протягом 5 років після завершення дослідження. Після завершення 5-річного терміну всі зразки і супровідні документи дослідження будуть знищені.

4.4. Опитувальник

Суб'єкти дослідження проходили інтерв'ю, під час якого підготовлений член дослідницької групи проведе анкетування, щоб задокументувати фактори ризику зараження інфекціями, що вивчаються в рамках цього протоколу. Анкетування проводитиметься у відокремленому місці, що буде спеціально визначеному у місці відбору біологічного матеріалу. Учасникам буде запропоновано відповісти на всі запитання чесно і в міру своїх можливостей, але їм буде повідомлено, що вони за власним бажанням можуть залишити будь-які запитання без відповіді. Оцінка стану суб'єкта також буде проведена в відокремленому місці кваліфікованим лікарем під час включення до дослідження. Анкетування й оцінка стану добровольця будуть

проводитися після надання інформованої згоди. Суб'єкт може прийняти рішення не відповідати на одне або більше запитань, і в цьому випадку його / її не буде виключено з дослідження.

4.5. Статус результатів лабораторних досліджень

Результати діагностичного дослідження на ССНФV і хантавірусні інфекції не надаватимуться для окремих суб'єктів дослідження і не можуть бути використані з метою надання медичної допомоги.

V. ЕТИЧНІ МІРКУВАННЯ

5.1. Інституційний або незалежний комітет з біоетики

До початку дослідження головний дослідник, доктор Литовка, представить протокол дослідження, форму інформованої згоди та інші документи для розгляду та в Комітет з біоетики ДУ ЦГЗ МОЗ України. Письмовий дозвіл на проведення дослідження буде зберігатися в архіві разом з усіма документами, що стосуються дослідження.

До обов'язків головного дослідника відноситься оперативне повідомлення комітету з біоетики про зміни або непередбачені ситуації під час виконання дослідницької діяльності. Зміни в процедурах протоколу або у складі основного персоналу не можуть бути ініційовані без схвалення з боку комітетів з біоетики, за винятком випадків, коли це необхідно для усунення небезпеки для учасника дослідження.

5.2. Етичне проведення дослідження

Це дослідження проводитиметься відповідно до протоколу та прийнятих нормативних документів, що діють в Україні. Доступ до ідентифікованих даних про людей, як суб'єктів дослідження, матиме лише місцевий дослідницький персонал на об'єктах Службі превентивної медицини МО України, що беруть участь у дослідженні. Весь персонал дослідження, що має доступ до даних, на основі яких можна встановити особу суб'єкта дослідження, буде проходити навчання з питань проведення досліджень за участі людей як суб'єктів (СІТІ). Матеріали навчання будуть підтримуватися в актуальному стані та зберігатися в архіві протягом усього періоду проведення дослідження.

5.3. Рутинні процедури з отримання інформованої згоди

Перед залученням до дослідження член дослідницької групи ознайомить кожного суб'єкта, що відповідає критеріям включення, із формою інформованої згоди, в якій детально описані мета протоколу, процедури та очікувані ризики. Дотримання базових елементів щодо інформованої згоди, визначених а українськими регуляторними нормами, передбачене протягом усього періоду проведення дослідження. Потенційним суб'єктам буде надано можливість поставити запитання та отримати роз'яснення.

Персонал дослідження буде перевіряти розуміння потенційними учасниками мети дослідження та процедур, що випливають з їх участі у дослідженні. Суб'єктам дослідження буде повідомлено, що участь пов'язана виключно з науковими цілями, не пов'язаних з медичним обслуговуванням, а відмова від участі в дослідженні не вплине на надання медичної допомоги. Форма інформованої згоди буде доступна англійською та українською мовами.

Член дослідницької групи, який читає згоду і завіряє справжність підпису суб'єкта дослідження, також підписує форму згоди та ставить на ній відповідну дату. Кожному суб'єкту дослідження буде надана копія ПІДПИСАНОЇ ТА ДАТОВАНОЇ форми згоди для власного зберігання. Суб'єктам дослідження буде повідомлено про те, що вони можуть відкликати свою згоду і припинити участь у будь-який час без обмеження або втрати переваг, які вони мали би в іншому випадку. Процес надання згоди буде задокументовано в медичній документації. Якщо суб'єкт не може читати та / або писати, документ про інформовану згоду буде зачитаний суб'єкту і підписаний / помічений у присутності свідка.

VI. ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

6.1. Початок дослідження

Перед початком дослідження медичний персонал кожної лабораторії-учасниці повинен виконати усі попередні вимоги для допущення до роботи в рамках дослідження. Копії актуальних резюме, чинні медичні ліцензії (або еквівалентні документи в Україні), а також копії чинного сертифікату про проходження навчання СІТІ з питань участі людей в дослідженнях; чинний протокол дослідження, підписаний головним дослідником та співдослідниками; письмові документи українського комітету з біоетики; а також затверджена комітетом з біоетики інформована згода, зберігатимуться в СЕУ командування Медичних сил Збройних Сил України.

6.2. Холодовий ланцюг для біологічних зразків

Увесь персонал, залучений до роботи з біологічними зразками, пройде навчання щодо підтримки належного холодового ланцюга до початку дослідження. Документація стосовно процедур дотримання холодового ланцюга буде оформлена персоналом лабораторії, який готує зразки для досліджень / зберігання. У разі виявлення порушення в процедурах холодового ланцюга зразок вилучається, про що інформують суб'єкт дослідження. Співробітники в рамках дослідження мають право спробувати повторно отримати зразки з дозволу суб'єкта дослідження.

6.3. Завершення дослідження

Це дослідження буде завершено, коли знеособлені зразки сироваток крові будуть протестовані в лабораторії і будуть отримані відповідні результати. Тривалість дослідження складе близько 12 місяців. Записи, дані та зразки зберігатимуться в безпечному місці протягом 5 років після завершення дослідження.

6.4. Остаточний звіт / аналіз даних

Головний дослідник, доктор Литовка, повинен представити підсумковий звіт про результати дослідження українському комітету з біоетики, а також БВСПК та МОЗ після завершення або припинення дослідження. Такий підсумковий звіт міститиме знеособлені дані з метою захисту конфіденційності суб'єктів дослідження.

6.5. Конфіденційність / безпека

Суб'єкти дослідження будуть визначені на основі номерів в журналах реєстрації добровольців. Перед доставкою до лабораторії, що проводить дослідження, із супровідної інформації до усіх зразків будуть видалені дані, що дозволяють ідентифікувати особу. Всі нормативні документи та документація дослідження з підписаними формами інформованої згоди, зв'язок між ідентифікуючою інформацією й ідентифікаційним номером добровольця, а також знеособлені записи дослідження будуть зберігатися в безпечному місці в СЕУ командування Медичних сил Збройних Сил України під наглядом головного дослідника.

Електронні форми документів, що містять будь-які відомості про добровольця будуть зберігатися на персональному комп'ютері з встановленим паролем та до якого обмежено доступ сторонніх осіб. Копії електронних документів будуть збережені на з'ємному диску (електронному носії), який буде зберігатися у головного дослідника.

Інформація, що дозволяє визначити особу, не буде зазначена у публікаціях або повідомленнях, створених у рамках цього дослідження. Ідентифікаційний номер суб'єкта буде використовуватися в тому випадку, якщо виникне необхідність виявити дані, що стосуються певного суб'єкта дослідження.

6.6. Публікація результатів дослідження

Усі дані, зібрані в ході дослідження, можуть бути опубліковані у відкритій медичній або військовій науковій літературі. У разі публікації особи суб'єктів дослідження буде суворо захищено. Комітет з питань публікації наукових даних, до складу якого входять основні дослідники проекту, буде відповідати за остаточне затвердження кількості дослідницьких робіт, написаних на основі результатів досліджень, а також за прийняття остаточних рішень у питаннях авторства стосовно кожної публікації.

6.7. Фінансування дослідницького проекту

Ця робота фінансується Програмою зменшення біологічної загрози в Україні за фінансової підтримки АЗЗ США у рамках реалізації спільного проекту біологічних досліджень UR-8 "Розповсюдження вірусу Крим-Конго геморагічної гарячки та хантавірусів в Україні та потенційна потреба диференціальної діагностики пацієнтів з підозрою на лептоспіроз".

VII. ОЦІНКА РИЗИКІВ

До основних ризиків, пов'язаних з цим дослідженням, відносяться порушення конфіденційності та незначні травми внаслідок венепункції. Ризики венепункції включають у себе: біль під час процедури, екхімоз (синець), запалення жирової клітковини (локалізоване інфекційне ураження шкіри), тромбофлебіт (згусток крові у місці флеботомії) і запаморочення або непритомність (втрата свідомості) під час або після процедури. Усі зазначені побічні ефекти вважаються мінімальними. Важкі наслідки після венепункції виникають дуже рідко. Ці ризики можуть бути зведені до мінімуму завдяки відповідному навчанню та контролю роботи фахівців, що здійснюють флеботомію. Суворе дотримання стерильності може звести до мінімуму ризик зараження. Відповідна техніка може звести до мінімуму необхідність багаторазових спроб забору крові і екхімозу / тромбофлебіту після флеботомії.

Дослідження передбачає лише мінімальні ризики, пов'язані з флеботомією та / або порушенням конфіденційності. Як зазначалося раніше, не існує безпосередньої вигоди для суб'єкта дослідження у зв'язку з участю в цьому дослідженні.

VIII. ПОВІДОМЛЕННЯ ПРО СЕРЬОЗНІ АБО НЕСПОДІВАНІ ПОБІЧНІ ЯВИЩА ТА НЕПЕРЕДБАЧЕНІ ПРОБЛЕМИ

Про непередбачені проблеми, що становлять ризик для досліджуваних або інших осіб, значні побічні явища (Significant Adverse Events – SAEs), пов'язані з участю в дослідженні, і будь-які випадки смерті суб'єктів дослідження необхідно негайно повідомлятися комітету з біоетики України (див. вище, розділ 2.5).

IX. ПІДПИС ДОСЛІДНИКА

«Я прочитав наведений вище протокол і погоджуюся провести дослідження відповідно до процедур та вимог, визначених у цьому документі.»

Головний дослідник

Дата (дд/мм/рр)

Головний співдослідник

Дата (дд/мм/рр)

Х. СПИСОК ДЖЕРЕЛ:

1. Zubach O, Telgina T, Semenyshyn O, Vasiunets L, Zinchuk A. Leptospirosis in Ukraine (Lviv Oblast): Clinical and Epidemiological Features. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018 Oct 18. doi: 10.1089/vbz.2018.2375. [Epub ahead of print] PMID: 30335592
2. Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):412-41. doi: 10.1128/CMR.00062-09. PubMed PMID: 20375360; PubMed Central PMCID: PMCPMC2863364.
3. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2004;64(3):145-60. Epub 2004/11/20. doi: S0166-3542(04)00163-9 [pii] 10.1016/j.antiviral.2004.08.001. PubMed PMID: 15550268.
4. Avsic Zupanc T, Korva M, Markotic A. HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res.* 2014;187:27-33. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.042. PubMed PMID: 24472777.
5. Huttunen NP, Makela S, Pokka T, Mustonen J, Uhari M. Systematic literature review of symptoms, signs and severity of serologically confirmed nephropathia epidemica in paediatric and adult patients. *Scand J Infect Dis.* 2011;43(6-7):405-10. doi: 10.3109/00365548.2011.559666. PubMed PMID: 21341977.
6. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898. PubMed PMID: 26379143; PubMed Central PMCID: PMCPMC4574773.
7. Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, Shepherd SP, McGillivray GM, Erasmus MJ, et al. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(1):120-32. Epub 1987/01/01. PubMed PMID: 3101525.
8. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(4):203-14. Epub 2006/03/24. doi: S1473-3099(06)70435-2 [pii] 10.1016/S1473-3099(06)70435-2. PubMed PMID: 16554245.
9. Papa A. Dobrava-Belgrade virus: phylogeny, epidemiology, disease. *Antiviral Res.* 2012;95(2):104-17. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.05.011. PubMed PMID: 22659378.
10. Meier M, Kramer J, Jabs WJ, Nolte C, Hofmann J, Kruger DH, et al. Proteinuria and the Clinical Course of Dobrava-Belgrade Hantavirus Infection. *Nephron Extra.* 2018;8(1):1-10. doi: 10.1159/000486322. PubMed PMID: 29849535; PubMed Central PMCID: PMCPMC5968261.
11. Krautkramer E, Nussbag C, Baumann A, Schafer J, Hofmann J, Schnitzler P, et al. Clinical characterization of two severe cases of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) caused by hantaviruses Puumala and Dobrava-Belgrade genotype Sochi. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):675. doi: 10.1186/s12879-016-2012-2. PubMed PMID: 27842513; PubMed Central PMCID: PMCPMC5109704.
12. Hofmann J, Meier M, Enders M, Fuhrer A, Ettinger J, Klempa B, et al. Hantavirus disease in Germany due to infection with Dobrava-Belgrade virus genotype Kurkino. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O648-55. doi: 10.1111/1469-0691.12543. PubMed PMID: 24438436.
13. Settergren B. Clinical aspects of nephropathia epidemica (Puumala virus infection) in Europe: a review. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(2):125-32. PubMed PMID: 10826895.
14. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71. PubMed PMID: 14652202.
15. Markovych VP, Sakal MM, Melnyk BM. Natural foci of hemorrhagic fever in Zakarpattia. Past, present and forecast / Epidemiological surveillance of EDI and their prevention in Ukraine MoH of Ukraine 2004. p. 91-3.
16. Avakyan AA, Shemshylevich SB, Meshchenko VM, editors. Clinical and epidemiological materials on hemorrhagic nephrosis-nephritis in Zakarpattia. Joint scientific session on regional pathology of neuroinfections; 1957 October 9-12, 1957; Lviv.

17. Kozak IP, Bogomolets O. Modern aspects of virology diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome. Kyiv: National Medical University; 2008.
18. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(12):1040-55. Epub 2004/12/21. doi: CLM1022 [pii]
10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x. PubMed PMID: 15606630.
19. Mardani M, Rahnavardi M, Rajaeinejad M, Naini KH, Chinikar S, Pourmalek F, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers in Iran: a seroprevalence study in two endemic regions. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):443-5. Epub 2007/03/16. doi: 76/3/443 [pii]. PubMed PMID: 17360865.
20. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30(5-6):375-89. Epub 2007/08/19. doi: S0147-9571(07)00064-1 [pii]
10.1016/j.cimid.2007.07.001. PubMed PMID: 17692916.
21. Lozinski IM, Vynograd NO. Arboviruses and arboviruses infections in the forest-steppe zone of Ukraine. *Microbiological Magazine.* 1998;2:49-60.
22. Avsic-Zupanc T, Toney A, Anderson K, Chu YK, Schmaljohn C. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 11):2801-8. Epub 1995/11/01. PubMed PMID: 7595387.
23. Avsic-Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M, Trilar T, Poljak M, Vaheri A, et al. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 7):1747-55. Epub 2000/06/22. PubMed PMID: 10859380.
24. Golovljova I, Vasilenko V, Prukk T, Brus Sjolander K, Plyusnin A, Lundkvist A. Puumala and Dobrava hantaviruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Estonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(12):968-9. Epub 2001/02/24. PubMed PMID: 11205639.
25. Jakab F, Horvath G, Ferenczi E, Sebok J, Varecza Z, Szucs G. Detection of Dobrava hantaviruses in *Apodemus agrarius* mice in the Transdanubian region of Hungary. *Virus Res.* 2007;128(1-2):149-52. Epub 2007/05/26. doi: S0168-1702(07)00147-5 [pii]
10.1016/j.virusres.2007.04.015. PubMed PMID: 17524512.
26. Klempa B, Stanko M, Labuda M, Ulrich R, Meisel H, Kruger DH. Central European Dobrava Hantavirus isolate from a striped field mouse (*Apodemus agrarius*). *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2756-63. Epub 2005/06/16. doi: 43/6/2756 [pii]
10.1128/JCM.43.6.2756-2763.2005. PubMed PMID: 15956394; PubMed Central PMCID: PMC1151903.
27. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva YV, Morozov VG, Okulova NM, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(4):617-25. Epub 2008/04/09. PubMed PMID: 18394280; PubMed Central PMCID: PMC2570905.
28. Klingstrom J, Hardestam J, Lundkvist A. Dobrava, but not Saaremaa, hantavirus is lethal and induces nitric oxide production in suckling mice. *Microbes Infect.* 2006;8(3):728-37. Epub 2006/03/04. doi: S1286-4579(05)00350-3 [pii]
10.1016/j.micinf.2005.09.010. PubMed PMID: 16513381.
29. Papa A, Bojovic B, Antoniadis A. Hantaviruses in Serbia and Montenegro. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):1015-8. Epub 2006/05/19. PubMed PMID: 16707066.
30. Clement J, Lameire N, Keyaerts E, Maes P, Van Ranst M. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):752-3; discussion 3-4. Epub 2003/12/04. doi: S1473309903008272 [pii]. PubMed PMID: 14652198.
31. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis.* 1989;11 Suppl 4:S801-6. Epub 1989/05/01. PubMed PMID: 2501854.

32. Shepherd AJ, Leman PA, Swanepoel R. Viremia and antibody response of small African and laboratory animals to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(5):541-7. Epub 1989/05/01. PubMed PMID: 2499205.
33. Schmaljohn CS, Dalrymple JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology.* 1983;131(2):482-91. PubMed PMID: 6419460.
34. Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, Dalrymple JM. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology.* 1986;155(2):633-43. Epub 1986/12/01. PubMed PMID: 3024404.
35. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, et al. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis.* 1980;141(2):131-4. Epub 1980/02/01. PubMed PMID: 6102587.
36. Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Narvanen A, Julkunen I, Lundkvist A, Plyusnin A, et al. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J Med Virol.* 1995;46(4):293-303. Epub 1995/08/01. PubMed PMID: 7595404.
37. Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Stenlund H, Avsic-Zupanc T, Hjelle B, et al. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol.* 1997;35(5):1122-30. Epub 1997/05/01. PubMed PMID: 9114393; PubMed Central PMCID: PMC232715.
38. Figueiredo LT, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Souza RL, Aquino VH. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(7):596-9. Epub 2008/08/23. doi: S0100-879X2008000700008 [pii]. PubMed PMID: 18719741.
39. Agampodi SB, Dahanayaka NJ, Nöckler K, Anne MS, Vinetz JM. Redefining Gold Standard Testing for Diagnosing Leptospirosis: Further Evidence from a Well-Characterized, Flood-Related Outbreak in Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(3):531-6. doi: 10.4269/ajtmh.16-0033. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27402521