

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (на базе Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

Зав. редакцией *Т.М. Курушина*  
E-mail: vopr.virusol@mail.ru

Вёрстка *Е.М. Архипова*

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2019. Т. 64. № 5. 201-256.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Учредители: **ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Общероссийская общественная организация «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

5

Том 64 · 2019

## Редакционная коллегия

**Главный редактор: ЛЬВОВ Д.К.** (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г.** (д.м.н., проф.)

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

### Члены редколлегии:

Альховский С.В. (д.б.н.)

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Акимкин В.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Алипер Т.И.** (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

**Ананьев В.Ю.** (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

**Баранов А.А.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Борисевич С.В.** (д.б.н., проф.; член-корр. РАН, Сергиев Посад, Россия)

**Брико Н.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Бутаев Т.М.** (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

**Гарбуз Ю.А.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

**Глинских Н.П.** (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

**Григорьев С.Н.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

**Заседателев А.С.** (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

**Злобин В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

**Иванов А.И.** (рук. ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; Хабаровск, Россия)

**Кузин А.А.** (д.м.н.; Санкт-Петербург, Россия)

**Кутырев В.В.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

**Леонова Г.Н.** (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Лисицин Е.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

**Локтев В.Б.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Лукашев А.Н.**, (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Мальшев Н.А.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Михайлов М.И.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Нетесов С.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Никифоров В.В.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Покровский А.Г.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Покровский В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Резник В.И.** (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

**Романенко В.В.** (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

**Степанова Т.Ф.** (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

**Тутельян А.В.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Чучалин А.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Шестопалов А.М.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Щелканов М.Ю.** (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Янович В.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Виноград Н.А.** (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

**Грибкова Н.В.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Титов А.П.** (д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

**Becker J.** (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

**Berencsi G.** (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** (PhD; San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** (PhD; Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

**Mackenzie J.** (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** (PhD; Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**Petrenkienė V.** (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** (MD, Essen, Germany)

**Sakoda Y.** (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

**Tashiro M.** (PhD, MD; Tokyo, Japan)

**Turan K.** (PhD, Assoc. Prof.; Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** (Docent; Turku, Finland)

**Webster R.** (PhD, DSc, Memphis, USA)

**Webby R.** (PhD, Memphis, USA)

**Yuelong Shu** (PhD, Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

Founders: Central Research Institute of Epidemiology,  
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

# VOPROSY VIROLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

## Volume 64 • 5 • 2019

### EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief:** LVOV D.K., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,

Corresponding Member of RAS

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,

Corresponding Member of RAS

**Al'khovskiy S.V.** – Doctor of Biological Sciences; **Barinskiy I.F.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zhirnov O.P.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Corresponding Member of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Kolobukhina L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Lobzin Yu.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Maleev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corresponding Member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

### EDITORIAL COUNCIL

**Akimkin V.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

**Anan'ev V.Yu.** – MD, PhD (Vladivostok, Russia)

**Baranov A.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

**Briko N.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Butaev T.M.** – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz, Russia)

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Glinskikh N.P.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg, Russia)

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan, Russia)

**Zasedatelev A.S.** – Doctor of physical, Prof. (Moscow, Russia)

**Zlobin V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk, Russia)

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Kuzin A.A.** – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)

**Kutyrev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov, Russia)

**Leonova G.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Lisitsin E.A.** – MD, PhD (Vladimir, Russia)

**Loktev V.B.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Lukashev A.N.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Malyshev N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Mikhaylov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Nikiforov V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Pokrovskiy V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

**Romanenko V.V.** – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg, Russia)

**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Chuchalin A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Shestopalov A.M.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Yanovich V.A.** – MD, PhD (Birobidzhan, Russia)

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista, Russia)

### INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

**Vinograd N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraina)

**Gribkova N.V.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

**Titov L.P.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Minsk, Republic of Belarus)

**Becker J.** – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

**Berenci G.** – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** – PhD, Prof. (Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** – PhD (San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** – PhD (Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** – PhD (Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** – PhD, Prof. (Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

**Mackenzie J.** – PhD, Prof. (Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** – PhD (Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** – PhD, MD, DSc., Prof. (Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

**Petrenkiene V.** – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** – MD (Essen, Germany)

**Sakoda Y.** – PhD, Assoc. Prof. (Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** – D.V.M., PhD, A.C.V.M. (Athens, USA)

**Tashiro M.** – PhD, MD (Tokyo, Japan)

**Turan K.** – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** – PhD, MD, Prof. (Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** – Docent (Turku, Finland)

**Webster R.** – PhD, DSc. (Memphis, USA)

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

**Yuelong Shu** – PhD (Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)

---

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

**Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А.**

Нужно быть готовыми к возврату оспы . . . . . 206

**Соломай Т.В., Семененко Т.А., Иванова М.Ю.**

Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени . . . . . 215

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Вакалова Е.В., Бутенко А.М., Вишневецкая Т.В., Дорофеева Т.Е.,  
Гительман А.К., Куликова Л.Н., Львов Д.К., Альховский С.В.**

Результаты обследования клещей в дельте Волги (Астраханская область, 2017 год)  
на вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV)  
и другие клещевые арбовирусы . . . . . 221

**Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Кондратова В.Н., Игнатова А.В.,  
Мудунов А.М., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э.**

Диагностика рака носоглотки с помощью серологических и молекулярных маркёров  
вируса Эпштейна-Барр (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4)  
в случаях невыявленного первичного очага опухоли . . . . . 229

**Иванова А.М., Имомалиева К.М., Наровлянский А.Н., Измestьева А.В.,  
Сарымсаков А.А., Билалов Э.Н., Ершов Ф.И.**

Глазные лекарственные плёнки в лечении экспериментального герпетического кератоконъюнктивита . . . . . 238

**Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И., Лапин Б.А.**

Маркёры гепатита А у обезьян Адлерского приматологического центра . . . . . 246

**Леонова Г.Н., Беликов С.И.**

Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа  
(*Flaviridae*, *Flavivirus*, TBEV-FE) на территории Азии . . . . . 250

---

## CONTENTS

### REVIEWS

- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A.**  
We should be prepared to smallpox re-emergence. . . . . 206
- Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu.**  
The role of Epstein-Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology. . . . . 215

### ORIGINAL RESEARCH

- Vakalova E.V., Butenko A.M., Vishnevskaya T.V., Dorofeeva T.E.,  
Gitelman A.K., Kulikova L.N., Lvov D.K., Alkhovsky S.V.**  
Results of investigation of ticks in Volga river delta (Astrakhan region, 2017)  
for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV)  
and other tick-borne arboviruses. . . . . 221
- Senyuta N.B., Smirnova K.V., Kondratova V.N., Ignatova A.V.,  
Mudunov A.M., Dushenkina T.E., Liechtenstein A.V., Gurtsevich V.E.**  
Diagnostics of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4)  
serological and molecular markers in cases of undetected primary tumor location . . . . . 229
- Ivanova A.M., Imomalieva K.M., Narovlyansky A.N.,  
Izmest'eva A.V., Sarymsakov A.A., Bilalov E.N., Ershov F.I.**  
Ophthalmic drug films in the therapy of experimental herpetic keratoconjunctivitis . . . . . 238
- Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I., Lapin B.A.**  
Markers of hepatitis A in the monkeys of the Adlers primate center . . . . . 246
- Leonova G.N., Belikov S.I.**  
Phylogenetic analysis and distribution of far eastern tick-borne encephalitis virus subtype  
(*Flaviridae*, *Flavivirus*, TBEV-FE) from Asia . . . . . 250

---

## ОБЗОРЫ

---

© ЩЕЛКУНОВ С.Н., ЩЕЛКУНОВА Г.А., 2019

Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А.

### Нужно быть готовыми к возврату оспы

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

В обзоре представлен краткий анализ результатов исследований, выполненных за 40 лет после ликвидации оспы и посвящённых изучению геномной организации и эволюции вируса натуральной оспы, разработке современных методов диагностики, вакцинопрофилактики и химиотерапии оспы и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека. В связи с тем, что вакцинация против оспы в ряде случаев приводила к тяжёлым побочным реакциям, Всемирная организация здравоохранения рекомендовала после 1980 г. прекратить её во всех странах. В результате этого решения человечество утратило иммунитет не только против оспы, но и против других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека. Участвовавшие в последние годы случаи инфицирования людей зоонозными ортопоксвирусами заставляют вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы в результате естественной эволюции этих вирусов. На основе анализа доступных архивных данных об эпидемиях оспы, истории древних цивилизаций, а также новейших данных об эволюционных взаимосвязях ортопоксвирусов авторами была сформулирована гипотеза о том, что оспа могла в прошлом неоднократно возникать в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя и исчезать вследствие недостаточной численности населения разрозненных древних цивилизаций. Лишь исторически последняя пандемия оспы продолжалась длительное время и была ликвидирована в XX веке при объединении усилий медиков и учёных многих стран под эгидой Всемирной организации здравоохранения. Таким образом, принципиальных запретов на возможность повторного появления в будущем оспы или схожего заболевания человека в процессе естественной эволюции существующих в настоящее время зоонозных ортопоксвирусов нет. Поэтому необходимо разрабатывать и широко внедрять современные методы эффективной и быстрой видоспецифичной диагностики всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, включая вирус натуральной оспы. Также важно разрабатывать новые безопасные методы профилактики и терапии ортопоксвирусных инфекций человека.

**Ключевые слова:** обзор; вирус натуральной оспы; ортопоксвирусы; эволюция; диагностика; вакцина; химиотерапия.

**Для цитирования:** Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 206-214. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>.

#### Информация об авторах:

Щелкунов С.Н., <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>Щелкунова Г.А., <https://orcid.org/0000-0003-0708-7826>

**Для корреспонденции:** Щелкунов Сергей Николаевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область; <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>. E-mail: [snschel@vector.nsc.ru](mailto:snschel@vector.nsc.ru)

Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A.

### We should be prepared to smallpox re-emergence

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia

The review contains a brief analysis of the results of investigations conducted during 40 years after smallpox eradication and directed to study genomic organization and evolution of variola virus (VARV) and development of modern diagnostics, vaccines and chemotherapies of smallpox and other zoonotic orthopoxviral infections of humans. Taking into account that smallpox vaccination in several cases had adverse side effects, WHO recommended ceasing this vaccination after 1980 in all countries of the world. The result of this decision is that the mankind lost the collective immunity not only to smallpox, but also to other zoonotic orthopoxvirus infections. The ever more frequently recorded human cases of zoonotic orthopoxvirus infections force to renew consideration of the problem of possible smallpox reemergence resulting from natural evolution of these viruses. Analysis of the available archive data on smallpox epidemics, the history of ancient civilizations, and the newest data on the evolutionary relationship of orthopoxviruses has allowed us to hypothesize that VARV could have repeatedly reemerged via evolutionary changes in a zoonotic ancestor virus and then disappeared because of insufficient population size of isolated ancient civilizations. Only the historically last smallpox pandemic continued for a long time and was contained and stopped in the 20<sup>th</sup> century thanks to the joint efforts of medics and scientists from many countries under the aegis of WHO. Thus, there is no fundamental prohibition on potential reemergence of smallpox or a similar human disease in future in the course of natural evolution of the currently existing zoonotic orthopoxviruses. Correspondingly, it is of the utmost importance to develop and widely adopt state-of-the-art methods for efficient and rapid species-specific diagnosis of all orthopoxvirus species pathogenic for humans, VARV included. It is also most important to develop new safe methods for prevention and therapy of human orthopoxvirus infections.

**Keywords:** review; smallpox virus; orthopoxviruses; evolution; diagnostics; vaccine; chemotherapy.

**For citation:** Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 206-214. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>

**For correspondence:** Sergei N. Shchelkunov, Sc.D., professor, chief researcher of the department of genomic research, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>. E-mail: [snshchel@vector.nsc.ru](mailto:snshchel@vector.nsc.ru)

**Information about authors:**

Shchelkunov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-6255-9745>

Shchelkunova G.A. <https://orcid.org/0000-0003-0708-7826>

**Acknowledgments.** This work was supported by grant of Russian Science Foundation №19-14-00006.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 25 April 2019

Accepted 16 July 2019

## Введение

На основании заключения Глобальной комиссии Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по удостоверению ликвидации натуральной оспы (декабрь 1979 г.) на 33-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения (ВАЗ) 8 мая 1980 г. было торжественно провозглашено, что все народы земли одержали победу над этой особо опасной инфекцией. С целью предотвратить случайное распространение возбудителя данной инфекции были предприняты мероприятия по сокращению числа лабораторий, сохраняющих вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV). В 1975 г. в разных странах мира существовало 75 лабораторий, сохраняющих VARV, в 1981 г. их осталось четыре (США, СССР, Южная Африка, Англия), а в 1984 г. – две лаборатории, получившие статус Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе и родственным инфекциям: НИИ вирусных препаратов (Москва, СССР) и Центры по контролю заболеваемости – CDC (Атланта, США) [1, 2].

Наличие даже этих двух строго контролируемых ВОЗ хранилищ жизнеспособных штаммов VARV рассматривалось как источник возможной биологической опасности. В связи с этим в марте 1986 г. на 4-м заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям (далее – Комитет ВОЗ) в Женеве было решено, что набора генов VARV, клонированных в неэкспрессионных сайтах бактериальных плазмид, достаточно для будущих исследований данного вируса. В связи с этим предложили получить клонотeki фрагментов ДНК VARV различного географического происхождения и разных подтипов (*major*, *minor*). Поскольку реализация решения об уничтожении всех штаммов VARV может привести к безвозвратному результату, члены Комитета ВОЗ провели консультации с 60 вирусологами, работающими в 21 стране. Только пять из них посчитали, что штаммы VARV нужно сохранять. Принимая всё это во внимание, Комитет ВОЗ заключил, что клонированные фрагменты ДНК VARV обеспечат достаточный референс-материал для решения любых проблем в будущем, включая возможные случаи натуральной оспы, и исследования, использующие культуры VARV, больше не понадобятся [3].

В декабре 1990 г. на 5-м заседании Комитета ВОЗ было принято решение о необходимости уничтожения коллекций штаммов VARV и их геномных ДНК. Для этого важно было обеспечить надёжную консервацию в биологически безопасной форме генетического материала разных изолятов VARV. С целью

сохранения информации об этом уникальном вирусе Комитет ВОЗ счёл необходимым предварительно провести исследование по секвенированию его генома. Были одобрены национальные программы расшифровки генома VARV, предложенные Россией (НИИ вирусных препаратов, Москва; НПО «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область) и США (CDC, Атланта, Джорджия; Институт геномных исследований, Гейтерсберг, Мэриленд), и учреждён Технический комитет ВОЗ по удостоверению полноты секвенирования генома VARV [4].

К середине 1992 г. российские учёные первыми завершили секвенирование генома высоковирулентного штамма VARV *major*, выделенного в Индии в 1967 г. во время вспышки инфекции с уровнем летальности 31% среди заболевших, и выполнили компьютерный анализ полученных данных [5]. Результаты этого исследования были доложены в сентябре 1992 г. на 9-й Международной конференции по поксвирусам и иридовирусам (Ле-Дьяблере, Швейцария) и Международном симпозиуме «100 лет вирусологии» (Санкт-Петербург, Россия) [6]. Спустя год американские исследователи завершили секвенирование полного генома другого высоковирулентного штамма – VARV *major* Bangladesh-1975, выделенного во время вспышки оспы с уровнем летальности 18,5% [7]. В совместном исследовании российские и американские учёные дополнительно выполнили секвенирование и анализ полного генома низковирулентного штамма VARV *minor* Garcia-1966 [8].

На 6-м заседании Комитета ВОЗ (9 сентября 1994 г., Женева, Швейцария) было решено хранить запасы ДНК вируса натуральной оспы в двух международных репозиториях: в НПО «Вектор», получившем к тому времени статус Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), и в CDC (США) [9].

Учитывая потенциальную опасность работы с живым VARV в Москве, на основании совместного приказа Минздравмедпрома России, Миннауки России, Госкомсанэпиднадзора России и Российской академии медицинских наук 27 сентября 1994 г. состоялась передача коллекции штаммов VARV из НИИ вирусных препаратов в ГНЦ ВБ «Вектор». После инспекционной проверки в 1995 г. комиссией ВОЗ лаборатории наивысшей физической защиты, предназначенной для работы с VARV, ВОЗ официально зарегистрировала создание на базе ГНЦ ВБ «Вектор» Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных ин-

фекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы. Право на хранение коллекции штаммов VARV и геномной ДНК этого вируса на базе ГНЦ ВБ «Вектор» было признано резолюцией ВАЗ 49.10 и подтверждено последующими резолюциями ВАЗ 52.10, 55.15 и 60.1.

По мере вовлечения широкого круга учёных в обсуждение вопроса о необходимости уничтожения штаммов VARV, хранящихся в двух официальных коллекциях, контролируемых ВОЗ, становилось ясно, что не следует торопиться с принятием окончательного решения об уничтожении этого уникального вируса.

В 1999 г. был организован Консультативный комитет ВОЗ по исследованиям вируса натуральной оспы, который стал контролировать работы с VARV и ежегодно проводить совещания всех специалистов, вовлечённых в изучение этого вируса и разработку новейших методов диагностики, профилактики и терапии оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Сторонники концепции обязательного уничтожения двух официальных коллекций штаммов VARV исходили из того, что их ликвидация закроет вопрос о потенциальной опасности выхода данного вируса в окружающую среду. При этом предполагалось, что исследования по разработке методов диагностики, профилактики и лечения оспы после уничтожения коллекций следует прекратить. Слабость данной позиции состоит в том, что нет полной уверенности в отсутствии непреднамеренного или умышленного неофициального сохранения штаммов VARV в каких-либо странах. Например, в Национальных институтах здоровья (США) в 2014 г. в низкотемпературном холодильнике обнаружили забытые стеклянные ампулы, хранящиеся более 60 лет и содержащие живой VARV [10].

Феноменальные успехи синтетической биологии, в том числе выполненный недавно синтез геномной ДНК и оживление вируса оспы лошадей [11], близкородственного вирусу натуральной оспы, показывают, что VARV также может быть синтезирован *de novo*. Всё это обесмысливает предлагаемое уничтожение коллекций данного вируса и указывает на необходимость активизации исследований по разработке новейших методов диагностики, профилактики и терапии не только оспы, но и других ортопоксвирусных инфекций человека.

### Ортопоксвирусные инфекции человека

В состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* входят такие патогенные для человека виды, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV) и родственные ему зоонозные вирусы оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и вакцинация вирус (*Vaccinia virus*, VACV) [1, 2].

Чаще всего зоонозные ортопоксвирусы первоначально выделяют от животных, которые находятся в непосредственной близости к человеку (коровы, буйволы, верблюды, обезьяны и др.) и становятся проме-

жуточными хозяевами вируса. В связи с этим нередко название вида ортопоксвируса не связано с животным, являющимся природным резервуаром данного вируса.

Этиологический агент оспы (VARV) способен инфицировать только человека, природный резервуар (другое чувствительное животное) данного вируса отсутствует. До момента ликвидации оспа была одним из самых опасных инфекционных заболеваний человека. Только в XX веке за неполные 80 лет, когда проводили массовую вакцинацию и вели интенсивную противозидемическую борьбу с натуральной оспой, от неё погибли не менее 400 млн человек [12]. По клиническим проявлениям выделяют два подтипа оспы: *variola major* – классический тип заболевания с уровнем летальности от 5 до 40% и *variola minor* – заболевание с лёгким течением и летальностью 0,1–2% [1].

Эпидемии *variola minor* в XX веке были характерны для Северной и Южной Америки, а также для Южной Африки [1]. Для них обнаружены географические вариации по уровню летальности. Во второй половине XX века наивысший уровень летальности отмечен для Индийского субконтинента и прилегающих районов (до 40%), в то время как в Индонезии, в Западной, Центральной и Восточной Африке он был существенно ниже (5–15%) [2]. Чем это обусловлено, до сих пор неясно.

Тяжесть заболевания зависит от возраста заражённых людей. В результате изучения вспышек *variola major* в XX веке обнаружено, что у не привитых против оспы детей до 5 лет и у взрослых старше 40 лет смертность может превышать 40–50%, в то время как у непривитых людей от 10 до 30 лет летальный исход существенно реже (5–15%) [13].

Натуральная оспа относится к высококонтагиозным болезням: по этому показателю она лишь несколько уступает кори и ветряной оспе. Входными воротами инфекции являются глотка или носоглотка и дыхательные пути. VARV может также попасть в организм через повреждённую кожу. Заразительность *variola major* (secondary attack rate) для восприимчивых лиц при тесном контакте в среднем превышала 58%. По материалам Программы ликвидации оспы установлено, что в среднем один больной заражал пять человек, хотя нередко эта цифра была значительно больше (до 20–35 человек) [1, 2].

MPXV вызывает инфекцию человека, по клиническим признакам напоминающую дискретную форму оспы, и в ряде случаев (до 10%) завершающуюся летальным исходом [1, 2]. Первый случай оспы обезьян у человека был идентифицирован в Заире (ныне Демократическая Республика Конго) в 1970 г. [14]. Проведённые в 1981–1986 гг. исследования позволили заключить, что оспа обезьян у людей – редкое спорадическое заболевание, возникающее при передаче MPXV от животного к человеку в зоне тропических ливневых лесов Центральной и Западной Африки. Природным резервуаром MPXV служат различные виды африканских животных, в основном грызуны.

При этом летальные случаи при заболевании людей оспой обезьян выявляли только в Центральной Африке [15]. В дальнейшем геномный анализ изолятов МРХV из разных регионов Африки позволил разделить МРХV на два подтипа: центрально- и западноафриканский [16]. При экспериментальном инфицировании чувствительных животных было показано, что центральноафриканский вариант МРХV обладает большей патогенностью по сравнению с западноафриканским [17].

В 2003 г. вспышка оспы обезьян среди людей была впервые зафиксирована вне Африканского континента. Возбудитель этой инфекции был завезён в США с большими грызунами, предназначенными для продажи в качестве домашних животных, из Ганы [18]. Доказано, что данную вспышку вызвал западноафриканский подтип МРХV. Именно этим можно объяснить отсутствие летальных исходов среди 72 заболевших.

В последнее время особое внимание привлекла вспышка оспы обезьян среди людей в Нигерии. С сентября 2017 г. по сентябрь 2018 г. выявлено 269 предположительных случаев оспы обезьян у людей, включая 115 лабораторно подтверждённых. Наибольшее число заболевших были в возрасте от 21 года до 40 лет. Сообщено о семи летальных исходах, при этом четыре пациента были ВИЧ-инфицированными [19]. Секвенированием вирусной ДНК подтверждено, что вспышку заболевания обуславливал МРХV западноафриканского подтипа. Это первые сообщения о смертельных исходах инфекции данного подтипа МРХV у людей.

Основным отличием оспы обезьян у человека от натуральной оспы является низкая эффективность передачи МРХV от человека к человеку, что до сих пор предотвращало переход локальных вспышек данного заболевания в эпидемии. Однако исследования последних лет указывают на увеличивающуюся трансмиссивность (эффективность передачи) МРХV в человеческой популяции. По данным ВОЗ, количество заболевших в результате передачи инфекции от человека к человеку на период окончания проекта по изучению оспы обезьян (1986 г.) составляло 29,6% общего числа зарегистрированных больных. Однако к 1997 г. это число достигло 73,0%. Возросло до восьми и число выявленных генераций в цепи передачи оспы обезьян от человека к человеку. Анализ имеющихся данных позволил заключить, что к 2010 г. (через 30 лет после прекращения противооспенной вакцинации) заболеваемость людей оспой обезьян в Демократической Республике Конго (Центральная Африка) возросла в 20 раз [20].

В последние годы также расширяется ареал распространения оспы обезьян среди людей в Африке. С 2010 по 2018 г., по данным ВОЗ, подтверждённые случаи оспы обезьян среди людей и животных зарегистрированы в Центральноафриканской Республике, Камеруне, Демократической Республике Конго, Либерии, Нигерии, Республике Конго и Сьерра-Леоне [21].

Важнейшим моментом вспышки оспы обезьян в Нигерии является то, что данная инфекция вышла за

пределы Африки: были зафиксированы два независимых случая заноса оспы обезьян в Великобританию и один в Израиль людьми, заразившимися при контакте с больными в Нигерии. Более того, один из пациентов в Великобритании заразил оспой обезьян медицинского работника [22].

Оспа коров у людей является спорадическим заболеванием, возникает при передаче СРХV от инфицированного животного (чаще всего домашнего) к человеку. СРХV относительно слабо патогенен для человека, но имеет очень широкий круг чувствительных животных. У людей с ослабленным иммунитетом инфицирование СРХV может завершиться летальным исходом [23]. Данное заболевание в основном выявляется в Европе, причём в последние годы зарегистрированы необычно большие вспышки этого заболевания у людей в Западной Европе. СРХV выявлен в организме грызунов и людей в разных географических районах России [2, 24].

В последние годы в Бразилии и Индии также значительно выросла заболеваемость сельскохозяйственных животных (коровы, лошади, буйволы) и людей ортопоксвирусной инфекцией, обусловленной зоонозным VACV (к этому виду относится и вирус оспы буйволов) [25, 26].

Наиболее запутанная ситуация сложилась с определением происхождения VACV. Данный вирус многие десятилетия использовался для вакцинации людей против натуральной оспы, и считалось, что этот вирус "*Variolae vaccinae*" (осповакцины) происходит от СРХV, введённого Э. Дженнером в 1796 г. в практику оспопрививания [1]. Лишь в XX веке выяснилось, что штаммы ортопоксвируса, используемого для противооспенной вакцинации, по свойствам существенно отличаются от природных изолятов СРХV, выделенных от коров, и других изученных к тому времени видов ортопоксвирусов [27]. Поэтому они были отнесены к отдельному виду *Vaccinia virus* [1, 2]. При этом утверждалось, что природный резервуар VACV неизвестен, и выдвигались многочисленные гипотезы о возникновении этого вируса в процессе пассажей вирусов-предшественников на коже животных при приготовлении препаратов противооспенной вакцины [1, 28]. Убеждённости в «искусственном» происхождении VACV оказалась настолько стойкой, что даже спустя годы после ликвидации оспы и прекращения противооспенной вакцинации людей выявление вспышек ортопоксвирусных инфекций среди крупного рогатого скота, обусловленных VACV-подобным вирусом, трактовалось как интродукция данного вируса домашним животным от вакцинированных людей [29]. Этому способствовала неизученность возможного распространения VACV в дикой природе.

Вопрос о происхождении VACV несколько прояснился после секвенирования полного генома вируса оспы лошадей (*Horsepox virus*, HSPV) [30], который оказался близкородственен изученным изолятам VACV. После этого обратили внимание на следующее: Э. Дженнер указывал, что для своей противооспенной вакцины часто использовал инфекционный материал,

взятый от лошадей и пассированный заражением коров [28]. На основании этого можно предположить, что VACV произошёл от зоонозного HSPV, который персистировал в природе параллельно с CPXV [31]. Судя по всему, в XIX веке для противооспенной вакцинации повсеместно применяли не CPXV, а изоляты HSPV, «потомки» которых спустя десятилетия были отнесены к отдельному виду *Vaccinia virus* [32]. Недавний филогенетический анализ полных геномов ортопоксвирусных изолятов, выделенных в Европе от животных и человека, показал, что на данном континенте в природе сосуществуют два глобально различаемых вида: CPXV-подобный и VACV-подобный [33].

CMLV по своим биологическим свойствам и данным филогенетического анализа полнотельности вирусного генома наиболее близок к VARV по сравнению с другими видами ортопоксвирусов [34]. До последнего времени было общепризнано, что круг хозяев CMLV ограничен одним видом животных – верблюдами. Однако недавно в Индии и Судане были лабораторно подтверждены первые случаи заболевания оспой верблюдов и у людей [35].

#### Эволюция ортопоксвирусов

Наиболее прямым и эффективным методом изучения эволюции близкородственных вирусов являются их полногеномное секвенирование и компьютерный анализ полученных данных. Для установления эволюционных взаимосвязей разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» первыми в мире расшифровали геномные ДНК вирусов CPXV [36] и MPXV [37], выделенных от больных людей. Выполненный анализ полных геномов VARV, MPXV, CPXV и VACV позволил обнаружить, что ДНК CPXV не только самая протяжённая среди изученных ортопоксвирусов, но и содержит все генетические элементы, характерные для других видов ортопоксвирусов. VARV, MPXV и VACV могут рассматриваться как варианты CPXV со специфичными для каждого вида делециями, перестройками и точечными мутациями в геноме. В связи с этим нами сделан вывод о том, что CPXV-подобный вирус был прародителем всех современных видов ортопоксвирусов, патогенных для человека [36, 38].

Накопленные данные позволили впервые провести сравнительный анализ стратегии геномов всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, выполнить первые филогенетические исследования данной группы вирусов и выявить их эволюционные взаимосвязи. Нами впервые было обнаружено, что западноафриканские и южноамериканские штаммы VARV формируют отдельный подтип (кладу), демонстрирующий существенные отличия в организации генома от всех других изученных географических вариантов VARV [39]. При этом принципиально, что внутри выявленного подтипа западноафриканские и южноамериканские штаммы VARV образуют две чётко различающиеся филогенетические подгруппы (субклады), что свидетельствует об их независимой эволюции.

Основываясь на результатах этого анализа и архивных данных о неоднократных заносах оспы из Западной Африки в Южную Америку в XVI–XVIII веках при перевозке рабов, нами впервые была выполнена количественная оценка скорости эволюции поксвирусов [40]. В дальнейшем секвенирование полных геномов большого набора штаммов VARV, выделенных в разные годы и в различных географических регионах, а также протяжённых сегментов генома дополнительных штаммов VARV, позволило уточнить датирование ключевых событий в эволюции этого вируса [41].

На основе анализа доступных архивных данных об эпидемиях оспы, об истории древних цивилизаций и новейших данных об эволюционных взаимосвязях ортопоксвирусов была сформулирована гипотеза о том, что оспа могла в прошлом неоднократно возникать в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя и исчезать вследствие недостаточной численности населения разрозненных древних цивилизаций [42]. Лишь исторически последняя пандемия оспы продолжалась длительное время и была ликвидирована в XX веке при объединении усилий медиков и учёных многих стран под эгидой ВОЗ. Принципиальных запретов на возможность повторного появления в будущем оспы или схожего заболевания человека в процессе естественной эволюции существующих в настоящее время зоонозных ортопоксвирусов нет.

#### Видоспецифичная ДНК-диагностика

Несмотря на то, что ортопоксвирусные инфекции имеют характерные внешние проявления – кожные поражения, опыт показывает, что клиническая диагностика зачастую оказывается ошибочной [2].

Разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) привела к созданию современных методов детекции и идентификации следовых количеств микроорганизмов в анализируемых образцах с высокой специфичностью и в короткое время. При этом не требуется манипуляций с живыми особо опасными инфекционными агентами, к которым относятся VARV и MPXV.

В случае патогенных для человека ортопоксвирусов наибольший интерес представляют тест-системы, обеспечивающие возможность родоспецифичной идентификации ДНК анализируемого вируса с одновременной её видоспецифичной дифференциацией. Сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» первыми разработали такие тест-системы на основе классической мультиплексной ПЦР [43], а также мультиплексной ПЦР в режиме реального времени [44] и зарегистрировали их в качестве медицинских изделий.

С помощью олигонуклеотидных микрочипов также удаётся обнаруживать следовые количества исследуемого материала в образце. Одним из важных преимуществ олигонуклеотидных микрочипов над другими видами диагностики на основе ПЦР является возможность проводить анализ по множеству генетических локусов одновременно, что значительно повышает надёжность метода. Для надёжной видоспецифичной

детекции ортопоксвирусов были разработаны различные варианты диагностических олигонуклеотидных микрочипов [45, 46].

Бурное развитие технологий секвенирования на сегодняшний день позволяет в короткие сроки получать информацию о полной нуклеотидной последовательности генома объекта исследования, поэтому всё чаще данные о выявленных случаях необычных ортопоксвирусных инфекций сопровождаются полногеномными последовательностями выделенных вирусных изолятов. Результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций и эпидемиологического надзора.

### Вакцинопрофилактика

Самым надёжным способом профилактики любого вирусного заболевания является искусственное инфицирование человека или животных низковирулентным вариантом этого вирусного агента или близкородственным слабопатогенным вирусом. Исторически первым примером такой защиты от инфекционного заболевания стало использование прививок против натуральной оспы – самого смертоносного эпидемиологически опасного для человека вирусного заболевания. Наряду с натуральной оспой с давних пор наблюдались схожие оспоподобные заболевания у домашних животных – коров, лошадей, буйволов. Накапливалась информация о том, что некоторые люди, контактировавшие с больными домашними животными, в относительно лёгкой форме переносили заболевание с образованием кожных поражений и становились после этого невосприимчивыми к летальной инфекции во время эпидемий натуральной оспы. На основании этих наблюдений в 1796 г. английский медик Э. Дженнер впервые предложил метод защиты от натуральной оспы прививкой людям инфекционного начала из пустул больных коров или лошадей. Используемый для иммунизации препарат был назван «вакцина» (*vaccine* от лат. *vaccina* – корова), а данный метод защиты от оспы получил название «вакцинация» (*vaccination*) [1, 12]. Термин «вакцинация» затем стали использовать в приложении к иммунизации против любых других инфекций.

Следует отметить, что царство вирусов было открыто лишь спустя столетие после введения в практику вакцинации против оспы. Ортопоксвирусы антигенно и иммунологически близки друг другу и дают перекрёстные серологические реакции и иммунную защиту. Именно это обеспечило надёжный способ защиты от натуральной оспы прививкой человеку вируса оспы коров или вируса оспы лошадей, которые в дальнейшем были повсеместно замещены на VACV, дающий менее выраженные побочные реакции при вакцинации. Данная вакцина оказалась настолько эффективной, что при её использовании для массовой вакцинации людей и строгом эпидемиологическом надзоре под эгидой ВОЗ натуральную оспу удалось ликвидировать. Это первый в истории человечества и пока единственный пример искоренения особо опас-

ного вирусного инфекционного заболевания человека [1, 2].

Прекращение вакцинации против натуральной оспы после 1980 г. привело к тому, что огромная часть населения земли в настоящее время не имеет иммунитета не только против натуральной оспы, но и против любых других зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Это создает новую ситуацию с возможностью циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, может приводить к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов.

Особую тревогу вызывает оспа обезьян у людей. В условиях длительного отсутствия вакцинации населения и значительно более частого инфицирования людей MPXV в результате естественной эволюции может приобрести свойства высокой частоты передачи от человека к человеку, характерные для VARV. Если это произойдет, то человечество встанет перед гораздо более сложной проблемой по сравнению с искоренением натуральной оспы. В первую очередь это обусловлено тем, что MPXV в отличие VARV имеет природный резервуар в виде многочисленных африканских грызунов.

Чтобы предотвратить развитие небольших вспышек в эпидемии и тем самым уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [31, 42]. Вакцины на основе VACV не имеют выраженной видоспецифичности в отношении ортопоксвирусов, патогенных для человека. Поэтому они могут быть применены при вспышках, обусловленных любым видом ортопоксвирусов, для иммунизации как человека, так и животных.

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат VACV, полученный размножением вируса на коже телят или других животных. Её использование для массовой вакцинации в настоящее время недопустимо из-за относительно большого числа возможных тяжёлых осложнений [1], что обусловлено возросшим в последние годы количеством людей с иммунодефицитами.

В современных условиях вакцинные штаммы VACV продуцируют на культурах клеток млекопитающих, и такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения [47]. Несмотря на то, что вакцины на культуре клеток производят в соответствии с современными стандартами, противооспенные вакцины первого и второго поколений могут вызывать серьёзные побочные реакции и поэтому имеют ограниченное применение.

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определённого штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. Например, самая изученная противооспенная вакцина третьего поколения MVA получена в результате большого числа пассажей штамма VACV Ankara на культуре кури-

ных фибробластов. В геноме штамма MVA возникли множественные мутации и протяжённые делеции относительно ДНК исходного штамма VACV. MVA характеризуется неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [48].

К настоящему времени противооспенная вакцина на основе штамма MVA (Imvanex/Imvamune) прошла многочисленные клинические испытания, включая пациентов с atopическим дерматитом и ВИЧ-инфицированных [49]. Imvanex/Imvamune лицензирована в странах Европы, в Канаде и США и предназначена для первичной вакцинации пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений.

Противооспенная вакцина третьего поколения LC16m8, лицензированная в Японии, была получена на основе VACV штамма *Lister* путём множественных пассажей на первичной культуре клеток почки кролика при пониженной температуре (30 °C). Клинические исследования VACV LC18m8 показали значительное снижение побочных эффектов по сравнению с традиционной вакциной на основе штамма *Lister*. Атенуация вакцинного штамма главным образом объясняется мутацией в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного вириона. В экспериментах на различных животных моделях показана протективная эффективность LC16m8, сравнимая с родительским штаммом *Lister* [50].

Новый подход к получению аттенуированных противооспенных вакцин четвёртого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных делеций/инсерций, нарушающих гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции. Наиболее подробно изученный вариант такого VACV представляет собой штамм NYVAC: в составе его генома делетирован блок из 12 генов и дополнительно нарушено 6 индивидуальных генов. Оказалось, что NYVAC индуцирует у человека значительно более низкий противооспенный иммунитет по сравнению с классической вакциной [51].

В ГНЦ ВБ «Вектор» последовательным введением направленных делеций/вставок в 6 индивидуальных генов штамма LIVP был получен высокоаттенуированный вариант VACdelta6 [52], который в настоящее время после цикла доклинических исследований проходит клинические испытания в качестве кандидатной противооспенной вакцины четвёртого поколения. Данная вакцина может быть использована и в комбинации с противооспенной ДНК-вакциной, созданной нами ранее [53, 54].

### Химиотерапия

Важное значение для лечения ортопоксвирусных инфекций человека могут представлять химиотерапевтические препараты, поиск которых за последние 20 лет увенчался определённым успехом. Первоначальный скрининг ингибиторов размножения ортопоксвирусов обычно проводят на культурах клеток. Поскольку адекватная животная модель натуральной

оспы отсутствует, тестирование потенциальных противооспенных лекарственных препаратов приходится выполнять на суррогатных животных моделях оспенной инфекции [55]. Показавшие *in vitro* высокую противовирусную активность соединения обычно изучают на таких животных моделях, как интраназальное или аэрозольное инфицирование мышей вирусом CPXV или обезьян вирусом MPXV. В последние годы активно использовали также кроликов, инфицированных вирусом оспы кроликов (входит в состав вида VACV), и луговых собачек или степных сурков, инфицированных вирусом MPXV [56]. При этом ни одна из суррогатных животных моделей ортопоксвирусной инфекции не соответствует полностью оспенной инфекции у человека. Поэтому предполагаемые противооспенные химиопрепараты изучают параллельно на разных животных моделях.

Ингибитор вирусной ДНК-полимеразы нуклеотидный аналог цидофовир (Cidofovir), разрешённый для клинического применения при цитомегаловирусном ретините, оказался эффективным антиортопоксвирусным соединением [55]. На разных животных моделях цидофовир также зарекомендовал себя как эффективный терапевтический препарат против ортопоксвирусных инфекций. Однако его существенными недостатками стали плохая водорастворимость и необходимость внутривенного введения. Поэтому был синтезирован липидный конъюгат цидофовира, который получил название CMX001 (Brincidofovir). Этот препарат широкого спектра антивирусного действия можно применять в таблетированной форме, и он обладает выраженной антиортопоксвирусной активностью [57].

Наибольший интерес в качестве противооспенного препарата представляет соединение ST-246, блокирующее последнюю стадию сборки покрытых оболочкой вирионов и предотвращающее выход вируса из инфицированной клетки [55]. ST-246 был идентифицирован в результате скрининга на противовирусную активность в культуре клеток библиотеки препаратов, состоящей из более 350 тыс. уникальных химических соединений. ST-246 показал низкую токсичность и высокую противовирусную эффективность при инфицировании мышей вирусами экстремелии (оспы мышей), VACV или CPXV, кроликов – вирусом оспы кроликов, луговых собачек – вирусом MPXV, обезьян – вирусами MPXV или VARV [58, 59]. Аналог ST-246, получивший название НИОХ-14, также показал высокую активность при терапии ортопоксвирусных инфекций на различных животных моделях [60].

Учитывая то, что при массовом применении противовирусных препаратов возникают устойчивые к их действию варианты вируса, необходимо продолжать поиск новых химиопрепаратов с разными молекулярными мишенями воздействия на VARV и другие патогенные для человека ортопоксвирусы.

### Заключение

Прекращение 40 лет назад противооспенной вакцинации и в связи с этим утрата человечеством коллективного иммунитета не только против натуральной

оспы, но и против других ортопоксвирусных инфекций создают условия для распространения зоонозных ортопоксвирусов среди людей, а это может способствовать естественной селекции высокопатогенных для человека и эпидемически опасных вирусных вариантов. В связи с этим в последние годы усилия ВОЗ направлены на разработку и испытание на базе двух Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе (Россия, США) современных методов экспресс-идентификации ортопоксвирусов, создание безопасных противооспепных вакцин новых поколений и химиопрепаратов, направленных против VARV и других ортопоксвирусов, патогенных для человека [56].

Диагностические методы необходимо ориентировать на быструю идентификацию не только VARV, но и МРХV, СРХV, VACV и CMLV. Принимая во внимание возросшее в последние годы число вспышек ортопоксвирусных инфекций животных и людей и их потенциальную опасность, важно обеспечить постоянный мониторинг этих инфекций во всех частях света, что позволит предотвратить развитие небольших вспышек в эпидемии и тем самым уменьшит риск возникновения высококонтагиозного и патогенного для человека ортопоксвируса.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00006).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and Its Eradication*. Geneva: World Health Organization; 1988.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. New York: Springer; 2005.
- Report of the Fourth Meeting of the Committee on Orthopoxvirus Infections (SE/86.163). Geneva; 1986.
- Report of the Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus Infections (CDS/SME/91.1). Geneva; 1990.
- Shchelkunov S.N., Resenchuk S.M., Totmenin A.V., Blinov V.M., Marennikova S.S., Sandakhchiev L.S. Comparison of the genetic maps of variola and vaccinia viruses. *FEBS Lett.* 1993; 327(3): 321-4. Doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81013-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81013-p)
- Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Totmenin A.V., Chizhikov V.E., Olenina L.V., Gutorov V.V., et al. Sequencing of the variola virus genome. In: Mahy B.W.J., Lvov D.K., eds. *Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1993: 93-105.
- Shchelkunov S.N., Massung R.F., Esposito J.J. Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. *Virus Res.* 1995; 36(1): 107-18. Doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)00113-q](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)00113-q)
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Loparev V.N., Safronov P.F., Gutorov V.V., Chizhikov V.E., et al. Alastrim smallpox variola minor virus genome DNA sequences. *Virology.* 2000; 266(2): 361-86. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0086>
- Report of the Meeting of the Ad Hoc Committee on Orthopoxvirus Infections (WHO/CDS/BVI/94.3). Geneva; 1994.
- WHO Advisory Committee on Variola Virus Research. Report of the Sixteenth Meeting (WHO/HSE/PED/CED/2015.2). Geneva; 2014.
- Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One.* 2018; 13(1): e0188453. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188453>
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses.* 2018; 10(3): 101. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10030101>
- Baxby D., Hanna W. Studies in smallpox and vaccination. 1913. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(4): 201-9. Doi: <https://doi.org/10.1002/rmv.361>
- Ladnyj I.D., Ziegler P., Kima E.A. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(5): 593-7.
- Jezek Z., Fenner F. Human monkeypox. In: *Monographs in Virology. Volume 17*. Basel, Switzerland: Karger; 1988: 1-140.
- Likos A.M., Sammons S.A., Olson V.A., Frace A.M., Li Y., Olsen-Rasmussen M., et al. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt. 10): 2661-72. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81215-0>
- Hutson C.L., Carroll D.S., Gallardo-Romero N., Drew C., Zaki S.R., Nagy T., et al. Comparison of monkeypox virus clade kinetics and pathology within the prairie dog animal model using a serial sacrifice study design. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015: 965710. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/965710>
- Reed K.D., Melski J.W., Graham M.B., Regnery R.L., Sotir M.J., Wegner M.V., et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(4): 342-50. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032299>
- Kabuga A.I., El Zowalaty M.E. A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria. *J. Med. Virol.* 2019; 91(4): 533-40. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.25348>
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16262-7. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2019; 17(2): 129-39. Doi: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1567330>
- Erez N., Achdout H., Milrot E., Schwartz Y., Wiener-Well Y., Paran N., et al. Diagnosis of imported monkeypox, Israel, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(5): 980-3. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2505.190076>
- Fassbender P., Zange S., Ibrahim S., Zoeller G., Herbstreit F., Meyer H. Generalized cowpox virus infection in a patient with HIV, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(3): 553-5. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2203.151158>
- Popova A.Y., Maksyutov R.A., Taranov O.S., Tregubchak T.V., Zaikovskaya A.V., Sergeev A.A., et al. Cowpox in a human, Russia, 2015. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145(4): 755-9. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268816002922>
- Venkatesan G., Balamurugan V., Prabhu M., Yogisharadhya R., Bora D.P., Gandhale P.N., et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet. Ital.* 2010; 46(4): 439-48.
- Peres M.G., Bacchiega T.S., Appolinario C.M., Vicente A.F., Mioni M.S.R., Ribeiro B.L.D., et al. Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. *Viruses.* 2018; 10(1): E42. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10010042>
- Downie A.W. The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus. *Br. J. Exp. Pathol.* 1939; 20(2): 158-76.
- Baxby D. The origins of vaccinia virus. *J. Infect. Dis.* 1977; 136(3): 453-5. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/136.3.453>
- Damaso C.R., Esposito J.J., Condit R.C., Moussatché N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology.* 2000; 277(2): 439-49. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0603>
- Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., et al. Genome of horsepox virus. *J. Virol.* 2006; 80(18): 9244-58. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00945-06>
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
- Schrack L., Tausch S.H., Dabrowski P.W., Damaso C.R., Esparza J., Nitsche A. An early american smallpox vaccine based on horse-

- pox. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(15): 1491-2. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1707600>
33. Carroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Ftrace M., et al. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23086. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023086>
  34. Gubser C., Smith G.L. The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 4): 855-72. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-855>
  35. Khalafalla A.I., Abdelazim F. Human and dromedary camel infection with camelpox virus in Eastern Sudan. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(4): 281-4. Doi: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2070>
  36. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., et al. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology.* 1998; 243(2): 432-60. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9039>
  37. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., et al. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Lett.* 2001; 509(1): 66-70. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03144-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03144-1)
  38. Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism. *Adv. Virol.* 2012; 2012: 524743. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/524743>
  39. Babkina I.N., Babkin I.V., Le U., Ropp S., Kline R., Damon I., et al. Phylogenetic comparison of the genomes of different strains of variola virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2004; 398: 316-9.
  40. Babkin I.V., Shchelkunov S.N. The time scale in poxvirus evolution. *Mol. Biol.* 2006; 40(1): 16-9.
  41. Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154(12): 1865-71. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0536-0>
  42. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2011; 29(Suppl. 4): D49-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.037>
  43. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19(1): 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.07.004>
  44. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2): 163-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
  45. Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., et al. Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(3): 753-7. Doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.3.753-757.2002>
  46. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., et al. Microarray assay for detection and discrimination of *Orthopoxvirus* species. *J. Med. Virol.* 2006; 78(10): 1325-40. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.20698>
  47. Sánchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejías-Pérez E., García-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses.* 2015; 7(4): 1726-803. Doi: <https://doi.org/10.3390/v7041726>
  48. Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara: History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017; 97: 187-243. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
  49. Overton E.T., Stapleton J., Frank I., Hassler S., Goepfert P.A., Barker D., et al. Safety and immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara-Bavarian Nordic smallpox vaccine in vaccinia-naïve and experienced human immunodeficiency virus-infected individuals: An Open-label, controlled clinical phase II trial. *Open Forum Infect. Dis.* 2015; 2(2): ofv040. Doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv040>
  50. Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015; 33(45): 6106-11. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.111>
  51. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 12): 2992-7. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004440-0>
  52. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016; 466: 35-8. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1607672916010105>
  53. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Kochneva G.V., Shchelkunov S.N. Immunogenicity and protective efficacy of a polyvalent DNA vaccine against human orthopoxvirus infections based on smallpox virus genes. *J. Vaccines.* 2013; 2013: 618324.
  54. Maksyutov R.A., Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. Comparing new-generation candidate vaccines against human orthopoxvirus infections. *Acta Naturae.* 2017; 9(2): 88-93.
  55. Smee D.F. Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal models. *Antivir. Chem. Chemother.* 2008; 19(3): 115-24. Doi: <https://doi.org/10.1177/095632020801900302>
  56. Olson V.A., Shchelkunov S.N. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses.* 2017; 9(9): 242. Doi: <https://doi.org/10.3390/v9090242>
  57. Zaitseva M., McCullough K.T., Cruz S., Thomas A., Diaz C.G., Keilholz L., et al. Postchallenge administration of brincidofovir protects healthy and immune-deficient mice reconstituted with limited numbers of T cells from lethal challenge with IHD-J-Luc vaccinia virus. *J. Virol.* 2015; 89(6): 3295-307. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.03340-14>
  58. Smith S.K., Self J., Weiss S., Carroll D., Braden Z., Regnery R.L., et al. Effective antiviral treatment of systemic orthopoxvirus disease: ST-246 treatment of prairie dogs infected with monkeypox virus. *J. Virol.* 2011; 85(17): 9176-87. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02173-10>
  59. Mucker E.M., Goff A.J., Shamblin J.D., Grosenbach D.W., Damon I.K., Mehal J.M., et al. Efficacy of tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (smallpox). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(12): 6246-53. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00977-13>
  60. Mazurkov O.Y., Kabanov A.S., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., et al. New effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(5): 1229-39. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000422>

Поступила 25.04.19

Принята в печать 16.07.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Соломай Т.В.<sup>1</sup>, Семенов Т.А.<sup>2,3</sup>, Иванова М.Ю.<sup>3</sup>

## Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени

<sup>1</sup>Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия;<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Обзор данных научной литературы посвящён клинико-эпидемиологической характеристике вирусных гепатитов В, С и Эпштейна–Барр вирусной инфекции. Для поиска необходимой литературы использованы базы данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, PubMed, CyberLeninka, РИНЦ. Показано, что вирус Эпштейна–Барр наряду с вирусами гепатитов В и С играет существенную роль в развитии вирус-опосредованных и аутоиммунных заболеваний печени, а также других органов (кишечник, сердце, почки, щитовидная железа и др.). Сходство указанных нозологий проявляется и в характере течения болезни: наличие первичной инфекции, протекающей в манифестной форме или латентно, с возможной последующей хронизацией процесса и его периодической реактивацией. Широкое распространение возбудителей в популяции человека определяет возможность сочетанного инфицирования вирусами Эпштейна–Барр и гепатитами В и С, однако данная проблема не нашла должного отражения в научной литературе. В обзоре показано, что нельзя игнорировать роль вируса Эпштейна–Барр в развитии заболеваний печени и внепечёночной патологии, а сочетание данного возбудителя с вирусами гепатитов В и С требует отдельного углублённого исследования.

**Ключевые слова:** вирусные гепатиты; Эпштейна–Барр вирусная инфекция; эпидемиология; патология печени; обзор.

**Для цитирования:** Соломай Т.В., Семенов Т.А., Иванова М.Ю. Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 215-220.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>

### Информация об авторах:

Соломай Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>Семенов Т.А., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>Иванова М.Ю., <https://orcid.org/0000-0001-8215-4609>

**Для корреспонденции:** Соломай Татьяна Валерьевна, канд. мед. наук, заместитель руководителя, Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, 123182, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>. E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)

Solomay T.V.<sup>1</sup>, Semenenko T.A.<sup>2,3</sup>, Ivanova M.Yu.

## The role of Epstein-Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology

<sup>1</sup>Interregional Department № 1, Moscow, 123182, Russia;<sup>2</sup>National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119048, Russia

A review of scientific literature data on clinical and epidemiological characterization of viral hepatitis B, C and Epstein-Barr viral infection is presented. Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, PubMed, CyberLeninka, RSCI databases were used to find the necessary literature. It was shown that Epstein-Barr virus along with hepatitis B and C viruses plays a significant role in the development of virus-mediated autoimmune liver diseases, as well as other organs (intestine, heart, kidneys, thyroid gland, etc.). The similarity of these nosologies is also evident in the nature of the course of the disease: the presence of a primary infection in a manifest or latent form, with possible subsequent chronization of the process and its periodic reactivation. Wide distribution of pathogens in the human population determines the possibility of mixed infections with Epstein-Barr virus and hepatitis B and C viruses, however, this problem has not been adequately described in the scientific literature. The review suggests that the role of Epstein-Barr virus in the development of liver diseases and extrahepatic pathology should not be ignored, and the combination of this pathogen with hepatitis B and C viruses required further in-depth studies.

**Keywords:** viral hepatitis; Epstein–Barr viral infection; epidemiology; liver pathology; review.

**For citation:** Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu. The role of Epstein-Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 215-220. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>

**For correspondence:** Tatyana V. Solomay, the Candidate of Medical Sciences, Deputy head of Interregional Department №1, Moscow, 123182, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>. E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)

### Information about authors:

Solomay T.V., <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>Seenenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>Ivanova M.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8215-4609>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 14 November 2019

Accepted 28 November 2019

В последние десятилетия интерес исследователей прикован к ситуации с вирусными гепатитами В и С, поскольку распространённость их возбудителей среди населения разных стран чрезвычайно высока. Однако в ряде случаев этиологическую причину гепатита не удаётся расшифровать, что позволяет предположить наличие более широкого спектра возбудителей, нежели известные вирусы гепатитов. Установлено, что патология печени может быть обусловлена различными герпесвирусами, в том числе вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), однако медицинское сообщество уделяет данной проблеме недостаточно внимания. Убиквитарное распространение инфекции, вызванной ВЭБ, на фоне высоких уровней заболеваемости вирусными гепатитами В и С определяет актуальность изучения как моноинфекций, вызванных указанными возбудителями, так и их сочетанного воздействия на организм человека.

Особенность инфекции, вызванной ВЭБ, заключается в многообразии клинических проявлений и вариантов течения болезни. В настоящее время установлено, что данный возбудитель – этиологический агент инфекционного мононуклеоза, который в Международной классификации болезней 10-го пересмотра обозначен, как «мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна–Барр» (B27.0).

Многочисленными исследованиями установлено, что первая встреча с возбудителем происходит, как правило, в детском возрасте или внутриутробно [1–4], после чего ВЭБ пожизненно (хронически) персистирует в организме человека, вызывая периодическую реактивацию инфекционного процесса [4, 5].

Одно из проявлений инфекционного мононуклеоза, как первичной инфекции, так и реактивации, – поражение печени, которое в период манифестации ВЭБ-инфекции носит характер острого гепатита, сопровождающегося гепатомегалией, желтухой, повышением уровней прямого и непрямого билирубина и активности трансаминаз [6–8]. При вирусных гепатитах В и С печень также является органом-мишенью [9, 10], что обуславливает необходимость дифференциальной диагностики данных нозологий.

На настоящий момент установлено, что поражения печени как при вирусных гепатитах, так и при ВЭБ-инфекции могут быть обусловлены поражением гепатоцитов самим вирусом или аутоантителами, выработка которых спровоцирована указанными возбудителями. Прямое поражение печёночных клеток вирусами гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС), а также ВЭБ, подтверждается выделением генетического материала патогенов из клеток печени больных при биопсии [10–12].

В пользу аутоиммунного компонента свидетельствуют исследования, проведённые в нашей стране

и за рубежом. Так, нижегородскими учёными показано, что у 1/3 обследованных детей, страдающих хроническими вирусными гепатитами В и С, выявлены высокие уровни аутоантител к тканям печени [13]. Об аутоиммунных проявлениях при ВЭБ-инфекции свидетельствуют результаты другого отечественного исследования, в ходе которого изучали иммунопатологические реакции у детей с первичным инфекционным мононуклеозом и реактиваций ВЭБ-инфекции [7]. Было показано, что аутоантитела к различным органам, в том числе к тканям печени, вырабатываются преимущественно при реактивации ВЭБ-инфекции, нежели при первичном инфекционном процессе, что, по мнению авторов, обусловлено недостаточной активацией клеточного иммунитета и смещением баланса в сторону превалирования Т-хелперов 2-го типа (Th2) при реактивации инфекции. Аналогичные данные приведены в клинических исследованиях зарубежных учёных, которые описывают случаи аутоиммунного гепатита у пациентов, перенесших ВЭБ-инфекцию [14, 15].

Исследователи отмечают активацию выработки аутоантител при вирусных гепатитах В, С и ВЭБ-инфекции к тканям не только печени, но и других органов, например кишечника [7], сердца [16–19], суставов [20–22], почек [23–25], щитовидной железы [26–29], кровеносных сосудов [30–32]. Активация аутоиммунных процессов, по мнению авторов, является следствием способности ВГВ, ВГС и ВЭБ уклоняться от иммунного ответа хозяина в результате поражения клеток лимфоидной ткани [29, 33, 34], при этом не исключена репликация возбудителей непосредственно в клетках поражённого органа, что подтверждается обнаружением их генетического материала [20, 33, 35, 36].

Например, при наблюдении за пациентной кардиомиопатией отечественным учёным удалось установить, что в основе этих состояний достаточно часто лежит миокардит с преобладанием вирусно-аутоиммунного компонента. В ходе исследования идентифицировали генетический материал вирусов герпеса человека 1–6-го типов, парвовируса В19 и др. Выявлена корреляционная зависимость между наличием вирусов в миокарде и иммунной активностью. Вирусный миокардит был диагностирован у 3,1 и 4,9% больных идиопатическими аритмиями и дилатационной кардиомиопатией соответственно, сочетанный вирусно-аутоиммунный – у 15,4 и 39,8%, аутоиммунный – у 81,5 и 55,3% [18, 19].

Для сравнения, у больных хроническим гепатитом С также наиболее распространены сердечно-сосудистые проявления – миокардит и дилатационная кардиомиопатия. При этом считается, что в патогенезе сердечно-сосудистых проявлений могут быть задействованы как

прямая вирусная цитотоксичность, так и непрямые иммуноопосредованные механизмы [37].

Помимо характера поражений ВГВ, ВГС и ВЭБ различных органов и тканей, вызванные этими патогенами нозологии объединяет течение болезни: наличие первичной инфекции, протекающей в манифестной форме или латентно, с возможной последующей хронизацией процесса, а также с периодической реактивацией инфекции на фоне латентного течения [4, 5, 9, 10, 38]. Так, в ходе наблюдения за 255 пациентами с хроническим неактивным гепатитом В реактивация инфекционного процесса, сопровождающаяся ростом вирусемии, была отмечена в 18,4% случаев. Кроме того, в 48,6% случаев выявлено повышение активности аланинаминотрансферазы [39].

Такое сходство обусловлено биологией возбудителей и их способностью ускользать от иммунного ответа хозяина. Несмотря на то, что гепатиты вызываются вирусами, относящимся к разным семействам (гепатит В – гепаднавирусы; гепатит С – флавирусы; ВЭБ – герпесвирусы), возбудители имеют различную генетическую структуру (ВЭБ и ВГВ – ДНК-содержащие, ВГС – РНК-содержащий вирус) [10, 35], для каждого из перечисленных патогенов в научной литературе описаны механизмы ускользания от иммунного ответа хозяина, сопряжённые с угнетением Т-регуляторного звена [40].

Особенности клинических проявлений вирусных гепатитов В, С и ВЭБ-инфекции, биологии их возбудителей определяют эпидемиологические характеристики данных нозологий. Установлено, что все три инфекции относятся к антропонозам и их источниками являются люди с острыми и хроническими формами заболеваний, протекающими как манифестно, так и латентно. Локализация возбудителя в организме определяет приоритетные механизмы и пути передачи.

Распространению ВЭБ способствует разнообразие путей передачи вируса: воздушно-капельный, контактно-бытовой (через предметы обихода, контаминированные слюной), прямой контакт при поцелуях, половой, вертикальный (как внутриутробно, так и при прохождении родовых путей) [34, 41–46]. Кроме того, в литературе описан искусственный механизм передачи ВЭБ, сопряжённый с проведением инвазивных манипуляций: трансплантация органов и тканей, переливание крови и её компонентов, эндоскопические, оперативные и иные инвазивные вмешательства,

инъекционное употребление наркотиков и др. [41, 44–46]. Инфицирование ВГВ и ВГС осуществляется также с помощью вышеперечисленных путей передачи возбудителей, за исключением воздушно-капельного [10, 47].

Наличие единых механизмов передачи указывает на то, что и группы повышенного риска заражения, в отношении которых должны проводиться профилактические мероприятия, будут сходными.

Основные сравнительные клинико-эпидемиологические критерии ВЭБ-инфекции и вирусных гепатитов В и С представлены в таблице.

Отдельную проблему представляет возможность сочетанного инфицирования возбудителями гемоконтактных вирусных гепатитов и ВЭБ. По данным разных авторов, от 80 до 100% взрослого населения имеют маркёры перенесённой ВЭБ-инфекции [48, 49]. Кроме того, по оценкам экспертов ВОЗ, с хронической ВГВ- и ВГС-инфекцией проживает около 3,4 и 0,9% населения земли соответственно [47]. Учитывая широкую распространённость гепатитов В и С и ВЭБ-инфекции и хроническое течение указанных заболеваний, сочетанное поражение печени данными возбудителями представляется возможным, однако в литературе оно описано недостаточно. Приводятся единичные сведения, позволяющие оценить взаимодействие указанных патогенов между собой на примере их сочетанного воздействия на организм человека.

Так, отечественными учёными установлена достоверная обратная умеренная корреляционная связь между иммуноглобулинами класса G к капсидному антигену ВЭБ и маркёрами инфицирования ВГВ и ВГС (HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС), что позволило выдвинуть предположение о подавлении репликации ВЭБ возбудителями гепатитов В и С [50].

Идея конкурентного взаимоотношения вирусов в организме человека подтверждается и результатами другого исследования. В ходе обследования онкогематологических больных было установлено, что маркёры острой ВЭБ-инфекции у пациентов без маркёров инфицирования ВГВ и ВГС выявлялись несколько чаще ( $17,4 \pm 25,0$ ), чем у пациентов с их наличием ( $12,5 \pm 21,4$ ). Однако различия были статистически недостоверными, что требует проведения дальнейших углублённых исследований в данной области [51].

Маркёры ранее перенесённой ВЭБ-инфекции в равной степени выявлялись в группах обследованных в

Клинико-эпидемиологические критерии сравнения ВЭБ-инфекции и вирусных гепатитов В и С

Критерий сравнения	ВЭБ-инфекция	Гепатит В	Гепатит С
Характер поражения органов и тканей	Вирус-опосредованный и аутоиммунный		
Характер течения болезни	Первичное инфицирование (манифестная или латентная форма) с последующей хронизацией; периодическая реактивация хронической латентной инфекции		
Механизмы передачи	Аэрозольный; контактный (в том числе половой), вертикальный, артифициальный	Контактный (в том числе половой), вертикальный, артифициальный	

Примечание: ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр.

обоих описанных исследованиях [50, 51], что указывает на более ранний контакт пациентов с ВЭБ, нежели с ВГВ и ВГС.

Необходимо отметить, что первый случай острого гепатита, обусловленного сочетанием ВГВ и ВЭБ, был описан S. Rao и соавт. в США в 2017 г. [52]. Авторы выявили активную репликацию ВГВ на фоне отрицательных результатов ПЦР-диагностики на наличие ВЭБ в крови пациента при положительных иммунологических маркерах острой ВЭБ-инфекции. По мнению авторов, микст-инфекция, вызванная ВГВ и ВЭБ, может привести к развитию тяжелой формы острого гепатита с формированием хронического гепатита В. Эти данные были также подтверждены китайскими исследователями в 2018 г., установившими, что в отличие от цитомегаловируса способного ингибировать пролиферацию ВГВ, коинфекция ВЭБ с ВГВ может негативно влиять на функцию печени и приводить к тяжелому поражению органа и плохому прогнозу [53]. Тем не менее описанных выше данных недостаточно для однозначного определения взаимоотношений между ВЭБ, ВГВ и ВГС в организме человека. Данная проблема остаётся открытой для изучения.

### Заключение

Широкая распространённость вирусных гепатитов В, С и инфекции, вызванной ВЭБ, тропность возбудителей к одним и тем же органам и тканям, их способность длительно персистировать в организме хозяина, уклоняясь от иммунного ответа, частичная общность механизмов передачи определяют актуальность клинико-эпидемиологического сопоставления данных нозологий и изучения особенностей коинфицирования.

Можно предположить, что при сочетанном инфицировании ВГВ, ВГС и ВЭБ указанные возбудители взаимодействуют, что проявляется в подавлении репликации ВЭБ вирусами гепатитов и приводит к усугублению клинической картины и формированию хронического вирусного гепатита. Однако для однозначного утверждения недостаточно доказательств, требуется проведение дальнейших исследований в данной области.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Семенов Т.А., Соломай Т.В.;

сбор и обработка материала – Соломай Т.В.; сбор материала – Иванова М.Ю.;

написание текста – Соломай Т.В.; редактирование – Семенов Т.А.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 12, 14, 15, 23, 30 - 32, 36, 37, 44, 52, 53 см. REFERENCES)

1. Разгуляева А.В., Уханова О.П., Безроднова С.М. Современные представления об этиологии, патогенезе, клинике, и лечении инфекционного мононуклеоза у детей. *Вестник Ставропольского государственного университета*. 2012; 78(1): 222-7.

3. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(4): 186-92. Doi: <http://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192>
4. Антонова М.В., Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Любимцева О.А., Ханипова Л.В., Огошкова Н.В. и др. Сравнительная характеристика клинического течения и лабораторных данных первичной Эпштейн-Барр вирусной инфекции и ее реактивации у детей различных возрастных групп. *Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области*. 2016; 2(3): 19-24.
5. Антонова М.В., Любимцева О.А., Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Бертрам Л.И., Молокова О.М. и др. Клиническая картина инфекционного мононуклеоза Эпштейн-Барр вирусной этиологии в возрастном аспекте. *Академический журнал Западной Сибири*. 2014; 10(5): 65-7.
6. Шаапуни А.Р., Мхитарян А.Л. Характер гепатита при инфекционном мононуклеозе у больных разного возраста с типичными и стертыми проявлениями болезни. *Актуальная инфектология*. 2013; (1): 25-8.
7. Хмилевская С.А., Зайцева И.А., Михайлова Е.В. Изменение функционального состояния печени при Эпштейн-Барр вирусном мононуклеозе у детей. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2009; 5(4): 572-7.
8. Дворяковская Г.М., Ивлева С.А., Дарманян А.С., Дворяковский И.В. Неинвазивная ультразвуковая оценка паренхимы печени и селезенки у детей с инфекционным мононуклеозом. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (1): 14-8.
9. Еналеева Д.Ш., Бешимова Д.Т. Зависимость активности аланинаминотрансферазы от пола при вирусных гепатитах В. *Теоретическая и клиническая медицина*. 2012; 93(3): 456-7.
10. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Никитина Г.Ю., Годков М.А., Скворцов С.В. *Эпидемиология гепатитов В и С в лечебно-профилактических учреждениях*. М.: Бионика; 2013.
11. Фазылов В.Х. Этиологические и патогенетические аспекты диагностики и лечения вирусных гепатитов. *Казанский медицинский журнал*. 2013; 94(6): 785-92.
13. Толкачев Н.И., Маянская И.В., Ашкинази В.И., Романова С.В., Каплина Н.А., Келекеева М.М. Аутоиммунная реактивность у детей с хроническими вирусными гепатитами В и С. *Медицинский альманах*. 2010; (2): 103-5.
16. Кантемирова М.Г., Луценко Я.В., Абросимова А.А., Кузьменко Л.Г., Полетаев А.Б., Дегтярева Е.А. Особенности спектра кардиоспецифических аутоантител у детей с аритмиями. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2010; (1): 68-72.
17. Балькова Л.А., Ивянский С.А., Щекина Н.В., Урзьева А.Н., Горбунова И.А. Дифференциальный диагноз воспалительного и невоспалительного поражения миокарда у юного спортсмена (описание клинического случая). *Вестник современной клинической медицины*. 2013; 6(3): 28-31.
18. Благова О.В., Недоступ А.В., Коган Е.А., Сулимов В.А., Осипова Ю.В., Седов В.П. и др. Клинико-морфологический подход к диагностике «идиопатических» аритмий и синдрома ДКМП как основа дифференциальной терапии. Часть 1 (диагностика). *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2014; 10(1): 62-72.
19. Благова О.В., Недоступ А.В., Коган Е.А., Сулимов В.А., Осипова Ю.В., Седов В.П. и др. Клинико-морфологический подход к диагностике «идиопатических» аритмий и синдрома ДКМП как основа дифференциальной терапии. Часть 2 (лечение). *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2014; 10(2): 195-202.
20. Листопадава А.П., Новикова В. П., Петровский А.Н., Мельникова И.Ю., Слизовский Н.В., Булгакова Т.В. Этиологическая структура хронического гастрита у детей, больных ювенильным хроническим артритом. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2014; 28(24): 33-6.
21. Мальков П.Г., Данилова Н.В., Москвина Л.В. Внепеченочные осложнения хронического вирусного гепатита с (обзор). *Фундаментальные исследования*. 2009; (5): 41-6.
22. Шекшина Е.В., Балабанова Р.М. Суставный синдром при вирусных гепатитах в и с и ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения. *Научно-практическая ревматология*. 2005; (2): 53-5.
24. Бархатова Т.В., Сенягина Н.Е., Краснов В.В. Распространенность маркеров герпесвирусных инфекций при острой патологии почек у детей. *Детские инфекции*. 2011; 10(3): 66-9.

25. Бархагова Т.В., Сенягина Н.Е., Краснов В.В. Распространенность маркеров герпесвирусных инфекций при хронической патологии почек у детей. *Медицинский альманах*. 2011; 6(19): 196-9.
26. Шауменова Ж.З. Внепеченочные проявления вирусных гепатитов. Поражения щитовидной железы. *Клиническая медицина Казахстана*. 2013; (1): 54-6.
27. Галеева З.М., Колчманова О.И. Современные представления о влиянии HCV-инфекции на состояние щитовидной железы. *Практическая медицина*. 2012; (3): 37-40.
28. Кравец Е.Б., Уразова О.И., Новицкий В.В., Роголева А.В., Недосекова Ю.В., Кузнецова В.Н. и др. Популяционный состав лимфоцитов и уровень инфицированности вирусами группы герпеса у больных аутоиммунным тиреоидитом. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2006; 2(4): 43-6.
29. Демчило А.П. Аутоиммунные проявления при хроническом вирусном гепатите С. *Проблемы здоровья и экологии*. 2005; (3): 86-93.
33. Семенов Т.А. Хронический гепатит В и проблема персистенции вируса с позиций иммунопатогенеза заболевания. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009; (4): 33-9.
34. Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Герпесвирусные инфекции человека: клинические особенности и возможности терапии. *РМЖ*. 2018; (8-1): 39-45.
35. Ярославцева Н.Г., Грумбокова Л.О., Тихомиров Д.С., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Гаранжа Т.А. и др. ПЦР-маркеры вирусных инфекций при хроническом гастрите у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(6): 54-8.
38. Буеверов А.О., Богомолов П.О. Хронический гепатит В и онкогематологические заболевания. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2013; 6(2): 210-6.
39. Бешимова Д.Т. Реактивация инфекционного процесса у больных с естественным течением хронического неактивного гепатита В. *Практическая медицина*. 2012; (1): 39-40.
40. Гариб Ф.Ю., Ризополу А.П. Стратегия иммунной эвазии патогенов: супрессия иммунного ответа путем активирования Т-регуляторных клеток хозяина. *Иммунология*. 2016; 37(1): 35-46. Doi: <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-4-190-194>
41. Астрелина Т.А., Яковлева М.В., Шахпазян Н.К., Гомзяков А.Е., Скоробогатова Е.В., Карпова Е.Э. и др. Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7(4): 68-72.
42. Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Этиологические факторы часто рецидивирующих воспалительных заболеваний ротоглотки – первый шаг к пониманию проблемы. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2018; (1): 62-72. Doi: <https://doi.org/10.14427/jirai.2018.1.62>
43. Марков И.С., Шунько Е.Е., Муравьева Н.Т. PCR-мониторинг основных TORCH-инфекций (токсоплазмоз, ЦМВ, ВПГ 1, 2, ВЭБ) в патологии новорожденных в Киеве. *Репродуктивное здоровье женщины*. 2002; (2): 122-9.
45. Чигвинцева Е.А., Евстигнеева Н.П., Терских В.А. Обследование крови доноров на вирусы семейства Herpes viridae. В кн.: *Тезисы I Российского конгресса дерматовенерологов*. СПб.; 2003: 22-3.
46. Волюнец Г.В., Хавкин А.И., Никонов Е.Л., Мурашкин В.Ю., Блат С.Ф. Эндоскопически визуализируемые изменения слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей в зависимости от инфекций Helicobacter pylori и Эпштейна-Барр. *Доказательная гастроэнтерология*. 2018; 7(2): 4-9. Doi: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2018724>
47. ВОЗ. Гепатит. Available at: <https://www.who.int/topics/hepatitis/ru/>
48. Котлова В.Б., Кокорева С.П., Трушкина А.В. Оптимизация лечения Эпштейна-Барр вирусного инфекционного мононуклеоза у детей. *Детские инфекции*. 2015; 14(3): 43-8.
49. Исаева Н.В., Резник В.И., Лебедева Л.А., Перескокова М.А. Диагностика заболеваний, связанных с вирусом Эпштейн-Барр в Хабаровском крае. *Дальневосточный Журнал Инфекционной патологии*. 2005; (7): 68-9.
50. Тотолян Г.Г., Ильченко Л.Ю., Федоров И.Г., Кожанова Т.В., Морозов И.А., Кюрегян К.К. и др. Влияние вирусов герпеса на течение хронических заболеваний печени. *Архив внутренней медицины*. 2013; (6): 18-24.
51. Корниенко М.Н., Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Никитина Г.Ю., Калугина М.Ю., Ярош Л.В. и др. Выявление маркеров оппортунистических инфекций и вирусных гепатитов у онкогематологических пациентов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(6): 33-8.

## REFERENCES

- Razgulyaeva A.V., Ukhanova O.P., Bezrodnova S.M. Modern ideas about the etiology, pathogenesis, clinic and treatment of infectious mononucleosis in children. *Vestnik Stavropol'skogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012; 78(1): 222-7. (in Russian)
- Yang E.V. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis.* 2003; 122(3): 205-12.
- Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(4): 186-92. Doi: <http://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> (in Russian)
- Antonova M.V., Kashuba E.A., Drozdova T.G., Lyubimtseva O.A., Khanipova L.V., Ogoshkova N.V., et al. Comparative characteristics of clinical course and laboratory data of primary Epstein-Barr viral infection and its reactivation in children of different age groups. *Vestnik Soveta molodykh uchennykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*. 2016; 2(3): 19-24. (in Russian)
- Antonova M.V., Lyubimtseva O.A., Kashuba E.A., Drozdova T.G., Bertram L.I., Molokova O.M., et al. Clinical picture of infectious mononucleosis Epstein-Barr viral etiology in the age aspect. *Akademicheskij zhurnal Zapadnoy Sibiri*. 2014; 10(5): 65-7. (in Russian)
- Shaapuni A.R., Mkhitarian A.L. The nature of hepatitis in infectious mononucleosis in patients of different ages with typical and erased manifestations of the disease. *Aktual'naya infektologiya*. 2013; (1): 25-8. (in Russian)
- Khmilevskaya S.A., Zaytseva I.A., Mikhaylova E.V. Changes in the functional state of the liver in Epstein-Barr viral mononucleosis in children. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2009; 5(4): 572-7. (in Russian)
- Dvoryakovskaya G.M., Ivleva S.A., Darmanyan A.S., Dvoryakovskiy I.V. Noninvasive ultrasound evaluation of liver and spleen parenchyma in children with infectious mononucleosis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2013; (1): 14-8. (in Russian)
- Enaleeva D.Sh., Beshimova D.T. Dependence of alanine aminotransferase activity on sex in viral hepatitis B. *Teoreticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2012; 93(3): 456-7. (in Russian)
- Akimkin V.G., Semenenko T.A., Nikitina G.Yu., Godkov M.A., Skvortsov S.V. *Epidemiology of Hepatitis B and C in Medical Institutions [Epidemiologiya gepatitov V i S v lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniyakh]*. Moscow: Bionika; 2013. (in Russian)
- Fazylov V.Kh. Etiological and pathogenetic aspects of diagnosis and treatment of viral hepatitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94(6): 785-92. (in Russian)
- Canović P., Gajović O., Todorović Z., Mijailović Z. Epstein-Barr virus hepatitis associated with icterus – a case report. *Med. Pregl.* 2006; 59(3-4): 179-82. Doi: <https://doi.org/10.2298/mpns0604179c> (in Serbian)
- Tolkacheva N.I., Mayanskaya I.V., Ashkinazi V.I., Romanova S.V., Kaplina N.A., Kelekeeva M.M. Autoimmune reactivity in children with chronic viral hepatitis B and C. *Meditsinskiy al'manakh*. 2010; (2): 103-5. (in Russian)
- Peng H., Lim T., Nam J., Lee J. Autoimmune hepatitis following Epstein-Barr virus infection: a diagnostic dilemma. *BMJ Case Rep.* 2019; 12(7): pii: e229615. Doi: <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-229615>
- Zellos A., Spoulou V., Roma-Giannikou E., Karentzou O., Dalekos G.N., Theodoridou M. Autoimmune hepatitis type-2 and Epstein-Barr virus infection in a toddler: art of facts or an artifact? *Ann. Hepatol.* 2013; 12(1): 147-51.
- Kantemirova M.G., Lutsenko Ya.V., Abrosimova A.A., Kuz'menko L.G., Poletaev A.B., Degtyareva E.A. Features of the spectrum of cardiospecific autoantibodies in children with arrhythmias. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2010; (1): 68-72. (in Russian)
- Balykova L.A., Iyvanskiy S.A., Shchekina N.V., Urzyaeva A.N., Gorbunova I.A. Differential diagnosis of inflammatory and non-inflammatory myocardial lesions in a young athlete (clinical case description). *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2013; 6(3): 28-31. (in Russian)

18. Blagova O.V., Nedostup A.V., Kogan E.A., Sulimov V.A., Osipova Yu.V., Sedov V.P., et al. Clinical and morphological approach to the diagnosis of "idiopathic" arrhythmias and DCMP syndrome as the basis of differential therapy. Part 1 (diagnosis). *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2014; 10(1): 62-72. (in Russian)
19. Blagova O.V., Nedostup A.V., Kogan E.A., Sulimov V.A., Osipova Yu.V., Sedov V.P., et al. Clinical and morphological approach to the diagnosis of "idiopathic" arrhythmias and DCMP syndrome as the basis of differential therapy. Part 2 (treatment). *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2014; 10(2): 195-202. (in Russian)
20. Listopadova A.P., Novikova V. P., Petrovskiy A.N., Mel'nikova I.Yu., Slizovskiy N.V., Bulgakova T.V. Etiological structure of chronic gastritis in children with juvenile chronic arthritis. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2014; 28(24): 33-6. (in Russian)
21. Mal'kov P.G., Danilova N.V., Moskvina L.V. Extrahepatic complications of chronic hepatitis C. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2009; (5): 41-6. (in Russian)
22. Shekshina E.V., Balabanova R.M. Articular syndrome in viral hepatitis vis and rheumatoid arthritis: problems of diagnosis and treatment. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2005; (2): 53-5. (in Russian)
23. Araya C.E., González-Peralta R.P., Skoda-Smith S., Dharnidharka V.R. Systemic Epstein-Barr virus infection associated with membranous nephropathy in children. *Clin. Nephrol*. 2006; 65(3): 160-4.
24. Barkhatova T.V., Senyagina N.E., Krasnov V.V. Prevalence of markers of herpesvirus infections in acute pathology of the kidney in children. *Detskije infektsii*. 2011; 10(3): 66-9. (in Russian)
25. Barkhatova T.V., Senyagina N.E., Krasnov V.V. Prevalence of markers of herpesvirus infections in chronic kidney disease in children. *Meditsinskiy al'manakh*. 2011; 6(19): 196-9. (in Russian)
26. Shaumenova Zh.Z. Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. Thyroid lesions. *Klinicheskaya meditsina Kazakhstana*. 2013; (1): 54-6. (in Russian)
27. Galeeva Z.M., Kolchermanova O.I. Modern ideas about the effect of HCV infection on the thyroid gland. *Prakticheskaya meditsina*. 2012; (3): 37-40. (in Russian)
28. Kravets E.B., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Rogaleva A.V., Nedosekova Yu.V., Kuznetsova V.N., et al. Population composition of lymphocytes and the level of infection with herpes viruses in patients with autoimmune thyroiditis. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2006; 2(4): 43-6. (in Russian)
29. Demchilo A.P. Autoimmune manifestations in chronic hepatitis C. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2005; (3): 86-93. (in Russian)
30. Spangenberg H.C., Blum H.E. Vasculitis and liver disease. *Praxis (Bern 1994)*. 2006; 95(40): 1557-62. Doi: <https://doi.org/10.1024/1661-8157.95.40.1557> (in German)
31. Sène D., Saadoun D., Limal N., Piette J.C., Cacoub P. Update in Hepatitis C virus associated extrahepatic manifestations. *Rev. Med. Interne*. 2007; 28(6): 388-93. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2006.10.321> (in French)
32. Mason A. Role of viral replication in extrahepatic syndromes related to hepatitis B virus infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol*. 2006; 52(1): 53-66.
33. Semenenko T.A. Chronic hepatitis B and problem of viral persistence from position of disease's immunopathogenesis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; (4): 33-9. (in Russian)
34. Shchubelko R.V., Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E. Human Herpesvirus infections: clinical features and therapeutic options. *RMZh*. 2018; (8-1): 39-45. (in Russian)
35. Yaroslavtseva N.G., Grumbkova L.O., Tikhomirov D.S., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Garanzha T.A., et al. PCR markers of viral infections in chronic gastritis in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(6): 54-8. (in Russian)
36. Godinho I., Nogueira E., Jorge S., Alves A.T., Gomes da Costa A. Membranoproliferative glomerulonephritis and interstitial nephritis in the setting of virus-related hemophagocytic syndrome. *Clin. Nephrol*. 2018; 89(6): 474-9. Doi: <https://doi.org/10.5414/CN109196>
37. Ilyas S.Z., Tabassum R., Hamed H., Rehman S.U., Qadri I. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations in lung and heart and antiviral therapy-related cardiopulmonary toxicity. *Viral Immunol*. 2017; 30(9): 633-41. Doi: <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0009>
38. Bueverov A.O., Bogomolov P.O. Chronic hepatitis b and hematological diseases. *Klinicheskaya onkologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika*. 2013; 6(2): 210-6. (in Russian)
39. Beshimova D.T. Reactivation of the infectious process in patients with the natural course of chronic inactive hepatitis B. *Prakticheskaya meditsina*. 2012; (1): 39-40. (in Russian)
40. Garib F.Yu., Rizopulu A.P. The immune Strategy of invasive pathogens: suppression of the immune response by activating T-regulatory cells of the host. *Immunologiya*. 2016; 37(1): 35-46. Doi: <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-4-190-194> (in Russian)
41. Astrelina T.A., Yakovleva M.V., Shakhpazyan N.K., Gomzyakov A.E., Skorobogatova E.V., Karpova E.E., et al. The significance of determining human herpesviruses in mesenchymal stem cells of bone marrow and placenta for clinical use. *Kletochnaya transplantologiya i tkaneyaya inzheneriya*. 2012; 7(4): 68-72. (in Russian)
42. Shchubelko R.V., Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E. Etiological factors frequently recurrent inflammatory diseases of the oropharynx is the first step to understanding the problem. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya*. 2018; (1): 62-72. Doi: <https://doi.org/10.14427/jipai.2018.1.62> (in Russian)
43. Markov I.S., Shun'ko E.E., Murav'eva N.T. PCR-monitoring of major TORCH infections (toxoplasmosis, CMV, HSV 1, 2, VEB) in neonatal pathology in Kiev. *Reproduktivnoe zdorov'e zhenshchiny*. 2002; (2): 122-9. (in Russian)
44. Wang H., Zhang T.T., Qi J.Q., Chu T.T., Miao M., Qiu H.Y., et al. Incidence, risk factors, and clinical significance of Epstein-Barr virus reactivation in myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol*. 2019; 98(4): 987-96. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00277-019-03603-3>
45. Chigvintseva E.A., Evstigneeva N.P., Terskikh V.A. Examination of donor blood for viruses of the family Herpesviridae. In: *Abstracts of the I Russian Congress of Dermatovenerologists [Tezisy I Rossiyskogo kongressa dermatovenerologov]*. St. Petersburg; 2003: 22-3. (in Russian)
46. Volynets G.V., Khavkin A.I., Nikonov E.L., Murashkin V.Yu., Blat S.F. Endoscopically visualized changes in the mucous membrane of the upper digestive tract in children depending on Helicobacter pylori and Epstein-Barr infections. *Dokazatel'naya gastroenterologiya*. 2018; 7(2): 4-9. Doi: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2018724> (in Russian)
47. WHO. Hepatitis. Available at: <https://www.who.int/topics/hepatitis/>
48. Kotlova V.B., Kokoreva S.P., Trushkina A.V. Optimization of the treatment of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. *Detskije infektsii*. 2015; 14(3): 43-8. (in Russian)
49. Isaeva N.V., Reznik V.I., Lebedeva L.A., Pereskova M.A. Diagnosis of diseases associated with the Epstein-Barr virus in the Khabarovsk territory. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy patologii*. 2005; (7): 68-9. (in Russian)
50. Totolyan G.G., Il'chenko L.Yu., Fedorov I.G., Kozhanova T.V., Morozov I.A., Kyuregyan K.K., et al. Influence of herpes viruses on the course of chronic liver diseases. *Arkhiv' vnutrenney meditsiny*. 2013; (6): 18-24. (in Russian)
51. Kornienco M.N., Rybalkina T.N., Karazhas N.V., Nikitina G.Yu., Kalugina M.Yu., Yarosh L.V., et al. Identification of markers of opportunistic infections and viral hepatitis in oncohematological patients. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2015; 20(6): 33-8. (in Russian)
52. Rao S.C., Ashraf I., Mir F., Samiullah S., Ibdah J.A., Tahan V. Dual infection with Hepatitis B and Epstein-Barr virus presenting with severe jaundice, coagulopathy and Hepatitis B virus chronicity outcome. *Am. J. Case Rep*. 2017; 18: 170-2. Doi: <https://doi.org/10.12659/ajcr.901688>
53. Hu J., Zhao H., Lou D., Gao H., Yang M., Zhang X., et al. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections, risk factors, and their influence on the liver function of patients with acute-on-chronic liver failure. *BMC Infect. Dis*. 2018; 18(1): 577. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3488-8>

Поступила 14.11.19

Принята в печать 28.11.19

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Вакалова Е.В.<sup>1,4,5</sup>, Бутенко А.М.<sup>2</sup>, Вишневская Т.В.<sup>2</sup>, Дорофеева Т.Е.<sup>2</sup>, Гительман А.К.<sup>2</sup>, Куликова Л.Н.<sup>3</sup>, Львов Д.К.<sup>2</sup>, Альховский С.В.<sup>2</sup>

## Результаты обследования клещей в дельте Волги (Астраханская область, 2017 год) на вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, ССНФV) и другие клещевые арбовирусы

<sup>1</sup> ФКУЗ «Астраханская противочумная станция» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав и благополучия человека Российской Федерации, 414024, г. Астрахань, Россия;

<sup>2</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав и благополучия человека Российской Федерации, 414057, г. Астрахань, Россия;

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, 414011, г. Астрахань, Россия;

<sup>5</sup> ГБУЗ Астраханской области «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», 414011, г. Астрахань, Россия

**Введение.** В дельте Волги (Астраханская область) расположены активные природные очаги Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), основным переносчиком которой служат клещи *Hyalomma marginatum*. Также здесь выявлена активная циркуляция вируса Дхори (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*). Вместе с тем, можно предположить, что в дельте Волги возможна циркуляция и других клещевых арбовирусов. В частности тех, которые циркулируют в соседних регионах и переносятся клещами *Hyalomma* spp. и *Dermacenter* spp., таких как вирусы Бханджа (*Phlebovirus: Phenuiviridae*), Вад Медани (*Orbivirus: Reoviridae*) и Тамды (*Orthonairovirus: Nairoviridae*).

**Цель работы** – исследование иксодовых клещей, распространённых в дельте Волги, на наличие клещевых арбовирусов, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани, и Тамды.

**Материал и методы.** Использовали молекулярно-генетические методы выявления и анализа нуклеиновых кислот (ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ).

**Результаты и обсуждение.** В 2017 г. заражённость клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в дельте Волги составила 1,98 и 0,4% соответственно. Результаты генетического анализа показали, что циркулирующая здесь популяция вируса Дхори гомогенна (99–100% по гену М) и формирует отдельный генетический кластер, для которого вирус Баткен (антигенный вариант вируса Дхори) из Средней Азии является ближайшей внешней группой. В то же время вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды в клещах *H. marginatum* и *D. marginatus*, распространённых в данном регионе, не выявлено.

**Заключение.** Вирус Дхори активно циркулирует в природных очагах ККГЛ в дельте Волги. Впервые получены количественные показатели соотношения заражённости вирусами ККГЛ и Дхори клещей *H. marginatum*.

**Ключевые слова:** клещевые арбовирусы; Крымская-Конго геморрагическая лихорадка; вирус Дхори; *Hyalomma marginatum*; *Dermacenter marginatus*.

**Для цитирования:** Вакалова Е.В., Бутенко А.М., Вишневская Т.В., Дорофеева Т.Е., Гительман А.К., Куликова Л.Н., Львов Д.К., Альховский С.В. Результаты обследования клещей в дельте Волги (Астраханская область, 2017 год) на вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, ССНФV) и другие клещевые арбовирусы. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5). 221-228

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-221-228>

### Информация об авторах:

Вакалова Е.В. <https://orcid.org/0000-0001-6121-5900>

Бутенко А.М., <https://orcid.org/0000-0001-6152-5685>

Вишневская Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-6963-8681>

Дорофеева Т.Е., <https://orcid.org/0000-0001-8846-0092>

Гительман А.К., <https://orcid.org/0000-0002-8410-2332>

Куликова Л.Н., <https://orcid.org/0000-0003-3066-3430>

Львов Д.К., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Альховский С.В., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>

**Для корреспонденции:** Альховский Сергей Владимирович, д-р биол. наук, руководитель лаборатории биотехнологии Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>. E-mail: [salkh@ya.ru](mailto:salkh@ya.ru); [s\\_alkhovsky@gamaleya.org](mailto:s_alkhovsky@gamaleya.org)

Vakalova E.V.<sup>1,4,5</sup>, Butenko A.M.<sup>2</sup>, Vishnevskaya T.V.<sup>2</sup>, Dorofeeva T.E.<sup>2</sup>, Gitelman A.K.<sup>2</sup>, Kulikova L.N.<sup>3</sup>, Lvov D.K.<sup>2</sup>, Alkhovsky S.V.<sup>2</sup>

## Results of investigation of ticks in Volga river delta (Astrakhan region, 2017) for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV) and other tick-borne arboviruses

<sup>1</sup>Astrakhan Anti-plague Station, Astrakhan, 414024, Russia;

<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F.Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in Astrakhan region, Astrakhan, 414057, Russia;

<sup>4</sup>Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414011, Russia;

<sup>5</sup>A.M. Nichogi Regional Infectious Clinical Hospital, Astrakhan, 414011, Russia

**Introduction.** There are natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) that vectored by *Hyalomma marginatum* ticks in Volga river delta (Astrakhan region, South of Russia). The circulation of Dhori virus (DHOV) (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*) has been also shown here. We hypothesized that other tick-borne arboviruses are also likely to circulate in the region. In particular, Bhanja virus (*Phlebovirus: Phenuiviridae*), Wad Medani virus (*Orbivirus: Reoviridae*), and Tamdy virus (*Orthonairovirus: Nairoviridae*), which were found to circulate in neighboring regions and are vectored by *Haemaphysalis* spp., *Dermacentor* spp., and *Hyalomma* spp. ticks.

**Goals and objectives.** The aim of the study was to examine ixodid ticks in Volga river delta for the presence of CCHFV, DHOV, Bhanja virus, Wad Medani virus, and Tamdy virus.

**Material and methods.** Ticks were collected in Volga river delta in 2017. We used molecular genetic methods for the detection and analysis of nucleic acids (PCR, sequencing, phylogenetic analysis).

**Results.** We detect CCHFV and DHOV RNA in *H. marginatum* ticks. The rate of infected *H. marginatum* ticks was 1.98% for CCHFV and 0.4% for DHOV. The results of genetic analysis showed that found DHOV strains are almost identical (99-100% in the M gene) and forms a separate genetic lineage alongside of Batken virus from Central Asia. At the same time, Bhanja virus, Wad Medani virus, and Tamdy virus were not found in ticks, collected in this region.

**Conclusions.** DHOV is circulating in the natural foci of CCHF in the Volga river delta. The ratio of infection of *H. marginatum* with CCHFV and DHOV was determined for the first time.

**Keywords:** tick-borne arboviruses; Crimean-Congo hemorrhagic fever virus; Dhori virus; *Hyalomma marginatum*; *Dermacentor marginatus*.

**For citation:** Vakalova E.V., Butenko A.M., Vishnevskaya T.V., Dorofeeva T.E., Gitelman A.K., Kulikova L.N., Lvov D.K., Alkhovsky S.V. Results of investigation of ticks in Volga river delta (Astrakhan region, 2017) for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV) and other tick-borne arboviruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 221-228. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-221-228>

**For correspondence:** Sergey V. Alkhovsky, Doctor of Biological Sciences, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F.Gamaleya, Moscow, 123098, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>. E-mail: [salkh@ya.ru](mailto:salkh@ya.ru); [s\\_alkhovskiy@gamaleya.org](mailto:s_alkhovskiy@gamaleya.org)

### Information about authors:

Vakalova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6121-5900>  
 Butenko A.M., <https://orcid.org/0000-0001-6152-5685>  
 Vishnevskaya T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6963-8681>  
 Dorofeeva T.E., <https://orcid.org/0000-0001-8846-0092>  
 Gitelman A.K., <https://orcid.org/0000-0002-8410-2332>  
 Kulikova L.N., <https://orcid.org/0000-0003-3066-3430>  
 Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>  
 Alkhovsky S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>

**Acknowledgments.** The work was carried out with the financial support of RFBR, project №18-04-01302a.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 21 November 2019

Accepted 28 November 2019

## Введение

В дельте Волги (Астраханская область) расположены активные природные очаги Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). Основным переносчиком ККГЛ являются клещи *Hyalomma marginatum*. Всего на территории Астраханской области встречается более 20 видов иксодовых (*Ixodidae*) клещей, включая *H. marginatum*, *H. scupense*, *H. asiaticum*, *H. anatolicum*, *H. dromedarii*, *H. detritum*, *H. aegyptium*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus*, *Boophilus annulatus*, *B. calcaratus*, *Rhipice-*

*phalus pumilio*, *Rh. schulzei*, *Rh. sanguineus*, *Rh. rossicus*, *Rh. turanicus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haem. impessum*, *Ixodes ricinus*, и *Ix. crenulatus* [1, 2]. В сборах с крупного рогатого скота доминируют *H. marginatum* (51,3%), *H. scupense* (43,6%) и *D. niveus* (2,2%), тогда как клещи, снятые с людей, представлены в основном *Rh. pumilio* (57,9%), *H. marginatum* (19,9%), *D. niveus* (6,9%), *Rh. sanguineus* (8,7%), *Rh. turanicus* (2,3%) и *Rh. rossicus* (1,8%). Остальные виды клещей составляют в сборах от 0,01 до 0,9% [3]. Многие из этих видов известны как переносчики клещевых арбовирусных инфекций человека и животных в других странах, однако связанные с ними

арбовирусы остаются недостаточно изученными в данном регионе. Из клещевых арбовирусов в дельте Волги ранее была показана циркуляция как минимум трёх вирусов: Дхори, Бханджа и Укуниими. При этом изоляция штаммов была получена только для вируса Дхори (*Dhori virus*, DHOV) (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*), который, так же как и ККГЛ, экологически связан с *H. marginatum* [4–6]. Вирус Дхори широко распространён в дельте Волги и способен вызывать у людей лихорадочное заболевание с явлениями менингоэнцефалита [7]. Циркуляция остальных упомянутых клещевых арбовирусов была определена только на основе серологических исследований сывороток крови людей и сельскохозяйственных животных.

Вирус Бханджа (*Bhanja virus*, BHAV) (*Phlebovirus: Phenuiviridae*) был впервые изолирован в Индии от клещей *Haem. intermedia* [8]. Позднее несколько штаммов вируса Бханджа были изолированы от *Haem. punctata* и *Haem. sulcata* в Восточной Европе и Италии [9–13]. Серологически (выявление антител у животных и людей) циркуляция вирусов Бханджа выявлена во многих странах Средиземноморья, Ближнего Востока, Азии, Африки [14]. Несколько штаммов вируса Бханджа изолированы от *Rh. bursa* и *D. marginatus* в Закавказье [15]. Инфекция вируса Бханджа является патогенной для молодняка мелкого рогатого скота, вызывая поражение центральной нервной системы [16]. У людей инфекция вируса Бханджа в основном протекает бессимптомно, однако описаны несколько случаев лихорадочного заболевания и менингоэнцефалита [17, 18]. Два серологически верифицированных случая лихорадки Бханджа были выявлены в Астраханской области в 2002 и 2003 гг. соответственно [19].

Исходя из видового состава распространённых здесь клещей, мы предположили, что в данном регионе возможна циркуляция и других клещевых арбовирусов. В частности тех, которые циркулируют в соседних регионах и переносятся клещами *Hyalomma* spp.: вирусы Вад Медани (*Wad Medani virus*, WMV) (*Orbivirus: Reoviridae*) и Тамды (*Tamdy virus*, TAMV) (*Orthonairovirus: Nairoviridae*).

Вирус Вад Медани распространён в Индии, Африке и Средней Азии. Несколько штаммов вируса Вад Медани были изолированы от клещей *H. asiaticum* в Туркмении, Казахстане и Армении и от клещей *H. anatolicum* в Таджикистане [20]. Значение вируса Вад Медани в инфекционной патологии человека и животных неизвестно.

Вирус Тамды был впервые изолирован из клещей *H. asiaticum* в Узбекистане [21]. Позднее было показано, что он широко распространён на территории Средней Азии (Узбекистан, Туркмения, Киргизия, Казахстан) и в Закавказье (Армения и Азербайджан). В основном вирус изолировали от *H. asiaticum*, *H. marginatum*, *Rh. turanicus* и *Haem. concinna*, а также от птиц и лихорадящих людей. В 2018 г. вирус Тамды был обнаружен в клещах *H. marginatum* в Турции [22]. Заражение человека вирусом Тамды приводит к развитию лихорадочного заболевания [23]. Лихорадочное заболевание, вызванное вирусом Тамды было

зарегистрировано в Синьцзян-Уйгурском автономном округе Китая в 2018 г. [24].

**Целью** настоящей работы было определение заражённости иксодовых клещей, распространённых в дельте Волги, клещевыми арбовирусами, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды.

### Материал и методы

Клещей собирали со скота и на флаг на территории Астраханской (11 районов) и Волгоградской (один район) областей, а также Республики Калмыкия (3 района) в апреле–июле 2017 г. Всего было собрано 3736 клещей: 3418 в Астраханской области, 37 в Волгоградской, 281 в Республике Калмыкия. Образцы были пулированы в 341 пробу (302, 7 и 32 соответственно). Видовой состав был представлен пятью видами клещей: *H. marginatum* (3071; 82,2%), *D. marginatus* (567; 15,2%), *H. scupense* (80; 2,1%), *Rh. schulzei* (8; 0,2%), *Rh. rossicus* (10; 0,3%). Видовой состав клещей из Астраханской области представлен в табл. 1. Пулы клещей или отдельные экземпляры напившихся клещей растирали в фарфоровой ступке и гомогенизировали в 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия. Далее суспензии осветляли 1 мин при 10 000 об/мин.

Для детекции вируса ККГЛ из полученной осветлённой суспензии выделяли РНК с использованием набора «Рибо-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и проводили ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов «Ампли Сенс® ССНФV-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и амплификатора «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) в соответствии с инструкцией производителя тест-систем.

Для выявления других клещевых арбовирусов РНК из суспензий выделяли по методу Хомчинского [25]. В качестве внутреннего контроля в каждую пробу был добавлен препарат РНК-содержащего фага MS2 в количестве, соответствующем приблизительно  $10^3$  РНК-копий на пробу. Праймеры для ПЦР для детекции вирусов Бханджа, Дхори, Вад Медани, Тамды были подобраны с использованием программы AlleleID 7.80 (PREMIER Biosoft, США). При использовании двухраундовой ПЦР (для вирусов Бханджа и Дхори) обратную транскрипцию проводили с использованием специфических обратного и прямого праймера и обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Scientific, США). Далее проводили два раунда ПЦР с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Положительные пробы использовали для получения более длинных ПЦР-фрагментов с использованием праймеров, представленных в табл. 2. Для детекции вирусов Тамды и Вад Медани были подобраны праймеры и флуоресцентные зонды для применения в одностадийной ОТ-ПЦР-РВ. Для ОТ-ПЦР-РВ использовали реагент TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (ThermoFisher Scientific, США). В качестве положительного контроля использовали штаммы вирусов, полученные из Государственной коллекции вирусов при Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Таблица 1

Видовой состав клещей, собранных в Астраханской области, и результаты их тестирования в ОТ-ПЦР на клещевые арбовирусы.

Территория	<i>Hyalomma marginatum</i> , абс. (%)	<i>Dermacentor marginatus</i> , абс. (%)	<i>Hyalomma scupense</i> , абс. (%)	<i>Rhipicephalus schulzei</i> , абс. (%)	<i>Rhipicephalus rossicus</i> , абс. (%)	Итого	ККГЛ*, абс. (%)	ДНОУ*, абс. (%)	ВНАУ, абс. (%)	ТАМУ, абс. (%)	WMV, абс. (%)
Ахтубинский район	21 (100)	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0
Володарский район	126 (89)	1 (1)	14 (10)	0	0	141	0	3 (2,4)	0	0	0
Енотаевский район	1006 (100)	0	0	0	0	1006	3 (0,3)	1 (0,1)	0	0	0
Икрянинский район	73 (57,4)	48 (37,8)	0	0	6 (4,8)	127	2 (2,7)	1 (0,8)	0	0	0
Камызякский район	123 (91)	5 (4)	0	7 (5)	0	135	5 (4)	4 (3,3)	0	0	0
Красноярский район	446 (90,7)	0	45 (9,1)	1 (0,2)	0	492	28 (6,3)	4 (0,9)	0	0	0
Лиманский район	91 (22,8)	309 (77,2)	0	0	0	400	1 (1)	0	0	0	0
Наримановский район	270 (100)	0	0	0	0	270	4 (1,48)	1 (0,4)	0	0	0
Приволжский район	235 (100)	0	0	0	0	235	10 (4,3)	0	0	0	0
Харабалинский район	558 (100)	0	0	0	0	558	6 (1,1)	0	0	0	0
Черноярский район	22 (67)	0	11 (33)	0	0	33	0	0	0	0	0
Всего...	2971 (87)	363 (10,6)	70 (2)	8 (0,23)	6 (0,17)	3418	59 (1,98)	14 (0,47)	0	0	0

Примечание. \* Для вирусов ККГЛ и Дхори представлены число положительных проб и вирусофорность (%) клещей *H. marginatum* без учёта остальных видов клещей.

Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Life Technologies, США) и специфических праймеров (см. табл. 2). Результаты реакции анализировали путём электрофоретического разделения на приборе «Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers» (Life Technologies, США). Анализировали полученные данные в программе SeqMan (DNASTar, США). Выравнивание последовательностей по алгоритму ClustalW и дальнейший филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>).

### Результаты

На первом этапе были подобраны праймеры для детекции в ОТ-ПЦР вирусов Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды. Для каждого вируса геномные последовательности разных штаммов были выровнены между собой и на основе полученных выравниваний выбраны наиболее консервативные участки генома. Для вируса Дхори использовали последовательности двух известных вирусов: Дхори и Баткен [26]. В результате мишенью для праймеров был выбран ген, кодирующий матриксный белок М. Для вируса Бханджа использовали последовательности штаммов вируса Бханджа, а также вирусов Раздан (*Razdan virus*, RAZV) и Палма (*Palma virus*, PLMV), изолированных в Армении и Португалии соответственно. Мишенью для праймеров был выбран ген нуклеокапсида N (сегмент S). Для вируса Вад Медани использовали геномные последовательности штаммов, изолированных в Средней Азии и Закавказье [20]. Мишенью для праймеров был выбран ген белка внутреннего кора T2 (сегмент 2). Для вируса Тамды использовали последовательности трёх штаммов из Средней Азии и Закавказья [27]. Мишенью для праймеров был выбран ген нуклеокапсида N (сегмент S). В результате для вирусов Вад Медани и Тамды были подобраны праймеры и зонды для их детекции в режиме ОТ-ПЦР-РВ. Для вирусов Дхори и Бханджа были подобраны праймеры для применения в стандартной двухраундовой ПЦР и последующей детекции ПЦР-фрагмента в агарозном геле. Подобранные праймеры представлены в табл. 2. Специфичность праймеров была протестирована на панели музейных штаммов различных клещевых арбовирусов (данные не представлены).

При исследовании материала на вирус ККГЛ выявлено 59 положительных проб, что составило 17,3% проанализированных пулированных образцов. Все положительные пробы были найдены в Астраханской области. Из них 58 принадлежали *H. marginatum* и один положительный образец был представлен пулом клещей *H. scupense*, собранных в Красноярском районе. Для расчёта вирусофорности принимали, что в положительном пуле заражён только один клещ. Рассчитанная таким образом вирусофорность клещей *H. marginatum* составила 1,98%. При этом вирусофорность *H. marginatum* в разных районах Астраханской области варьировала от 0 до 6,3% (Красноярский район) (см. табл. 1).

При исследовании материала на вирус Дхори выявлено 14 положительных проб, что составило 4,1% проанализированных пулированных образцов. Все положительные по вирусу Дхори образцы принадлежали *H. marginatum*, собранным в Астраханской области. Общая вирусофорность *H. marginatum* составила 0,47%. При этом, так же как и для вируса ККГЛ, заражённость клещей вирусом Дхори варьировала в разных районах (см. табл. 1). Наибольшее число положительных проб (по четыре) найдены в Камызякском и Красноярском районах, где вирусофорность клещей *H. marginatum* составила 3,3 и 0,9% соответственно. Три (2,4%) положительных пробы найдены в Володарском районе (см. табл. 1).

В шести образцах *H. marginatum* были одновременно обнаружены и вирус ККГЛ и вирус Дхори, что составило 1,75% проанализированных проб и 0,2% общего числа обследованных клещей *H. marginatum*.

С целью анализа генетических характеристик выявленных штаммов вируса Дхори для 12 из 14 положительных проб были амплифицированы два перекрывающихся ПЦР-фрагмента. Фрагменты были получены на матрице продукта I раунда с использованием сочетания праймеров 68F/524R и 234F/697R. Полученные фрагменты были секвенированы. В результате определена частичная последовательность (около 600 из 950 н.о.) гена М выявленных штаммов. Последовательности были депонированы в GenBank под номерами MN720206–MN720217. Результаты сравнительного генетического анализа показали, что выявленные штаммы вируса Дхори практически идентичны между собой (99–100% н.о.) по анализируемому гену. С другими вирусами, принадлежащими виду *Dhori thogotovirus*, геномные последовательности которых опубликованы в базе данных GenBank, выявленные штаммы имеют от 87,2 до 98,6% идентичности по данному участку генома. При этом наибольший уровень схожести (97,9–98,6%) выявленные штаммы ви-

руса Дхори имеют с вирусом Баткен (BTKV), выделенным от клещей *H. marginatum* в Киргизии в 1970 г. [26, 28]. На дендрограмме, построенной на основе полученных последовательностей, астраханские штаммы формируют отдельный кластер рядом с вирусом Баткен (см. рисунок).

Для вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды положительных ПЦР-образцов в исследуемом материале не найдено.

### Обсуждение

Целью настоящей работы было исследование заражённости клещей в дельте Волги клещевыми арбовирусами, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды. Согласно полученным данным, общая заражённость вирусом ККГЛ клещей *H. marginatum* в 2017 г. составила 1,98%, что сопоставимо с данными, полученными за 2016 г., – 1,5% [3]. Генетическая структура вирусной популяции вируса ККГЛ, циркулирующей в данном регионе, была изучена ранее [3, 29], поэтому мы не проводили дополнительный генетический анализ выявленных штаммов.

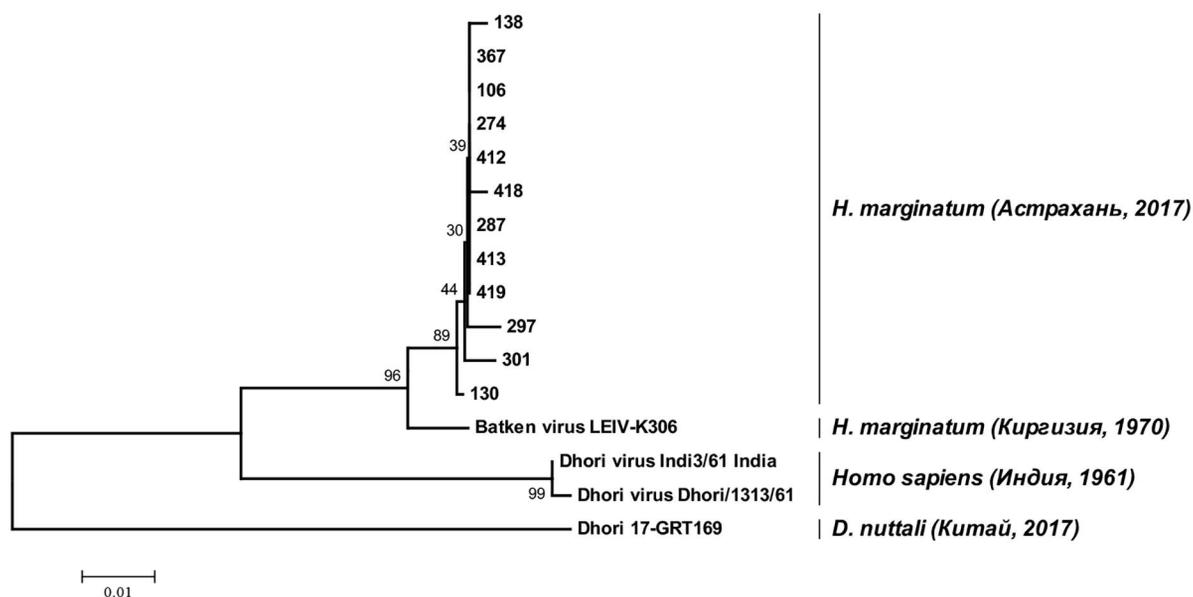
Циркуляция вируса Дхори в дельте Волги известна с 1971 г., когда несколько штаммов вируса были изолированы от клещей *H. marginatum* и комаров *Anopheles hyrcanus* [6]. Позднее вирус Дхори многократно выделяли здесь как от клещей *H. marginatum*, так и от их позвоночных прокормителей [4, 5]. Согласно полученным нами данным, заражённость клещей *H. marginatum* вирусом Дхори в 2017 г. составила 0,4%, что практически в 5 раз меньше, чем вирусом ККГЛ (1,98%). В других видах клещей, собранных здесь, вирус Дхори не найден. Мы обнаружили несколько образцов *H. marginatum*, одновременно положительных по вирусу ККГЛ и Дхори. Поскольку образцы представляли собой пулы клещей, мы не можем однозначно заключить, являются ли положительные находки микст-инфекцией ККГЛ/Дхори, или

Таблица 2

Праймеры и зонды, использованные в работе

Вирус; мишень	Название; последовательность	Назначение
Бханджа (Bhanja virus, BHAV, S сегмент)	BHAV162F; TTGATAAGGATGGCTGGAAAGATGA	OT* и I раунд ПЦР
	BHAV594R; TTGCCYCTCACYTTTGGGTTRAT	
	BHAV234F; CCAARGCCATGGCYAARATGTC	II раунд ПЦР
	BHAV573R; ATCAGYTGCGTGAARTARAAYTGCCA	
Дхори (Dhori virus, DHOV, M ген)	Batk68F; CCTGCGCTCGAATCTGGAAAAC	OT и I раунд ПЦР
	Batk697R; CTTGGTGRCCCTGCAGGATTGAGC	
	Batk234F; GAAGGGGTACAAAGCAAAGGATGG	II раунд ПЦР
	Batk524R; TTTAGGACGGGTGTGAGGGTGTGTTG	
Вад Медани (Wad Medani, WMV, T2 ген)	WM1452pr; YTCAGGAGATGACTTCCGCT	[REDACTED]
	F: WM1408F; TTTTATCTTGGATACGATCC	
	WM1408Fa; TTTTATCTCGGATATGATCC	
Тамды (Tamdy virus, TAMV, S сегмент)	TAMV1930pr; CGGCTCAAGGTATGTGCTCC	Зонд для ПЦР-РВ
	TAMV422F; AGGCTAATAATGCAGTCAT	OT-ПЦР-РВ
	TAMV557R; CTCTTCTTGTGGTCTCA	OT-ПЦР-РВ

Примечание. \*OT – обратная транскрипция.



Дендрограмма, построенная с использованием алгоритма ближайшего соседа (Neighbor-Joining method) на основе сравнения гена М вирусов вида *Dhoti thogotovirus* (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*) и выявленных положительных ОТ-ПЦР-проб (обозначены номерами). Справа указаны источник, место и год выделения (выявления) анализируемых вирусов. Эволюционная дистанция рассчитана с использованием двух-параметрической модели Кимуры (Kimura 2-parameter method). Филогенетический анализ и визуализация дендрограммы проведены с использованием программы MEGA7.

это разные клещи в пуле, инфицированные каждый отдельным вирусом. Ранее было показано, что при вирусологическом обследовании *H. marginatum* часто выделяются микст-изоляты ККГЛ/Дхори, что свидетельствует о возможности инфицирования клеща двумя вирусам одновременно [4, 5]. Вирусы ККГЛ и Дхори занимают общую экологическую нишу (клещ *H. marginatum*) и, вероятно, интерферируют. Интерференция может происходить как на уровне отдельной особи клеща, так и на популяционном уровне при взаимодействии переносчиков и их позвоночных хозяев. Таким образом, высказывается гипотеза, что заражённость клещей *H. marginatum* вирусом Дхори может быть одним из факторов, играющих роль в уровне активности природного очага ККГЛ наравне с другими биотическими и абиотическими факторами [4]. Полученные нами данные о соотношении заражённости клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в 2017 г. представляют основу для дальнейшего изучения их возможного взаимодействия в динамике. Согласно результатам проведённого генетического анализа, циркулирующая в дельте Волги популяция вируса Дхори, достаточно гомогенна и формирует отдельный генетический кластер, для которого вирус Баткен (антигенный вариант вируса Дхори) из Средней Азии является ближайшей внешней группой.

Ранее было показано, что в дельте Волги циркулирует вирус Бханджа. Хотя случаев выделения вируса в данном регионе не описано, при исследовании сывороток крови людей и животных были обнаружены специфические антитела к вирусу Бханджа. Два случая лихорадочного заболевания были выявлены здесь

в 2002 и 2003 гг. соответственно [19]. Кроме этого, среди распространённых в дельте Волги иксодовых клещей присутствуют виды, известные как его переносчики. Большинство известных штаммов вируса Бханджа были изолированы в Индии и Европе от клещей *Haemaphysalis* spp. Вместе с тем несколько штаммов вируса (включая его антигенный вариант, вирус Раздан (RAZV)) были изолированы от клещей *Rh. bursa* и *D. marginatus* в Армении и Азербайджане [15]. Вместе с клещами *H. marginatum* (2971 экземпляр) мы протестировали 363 экземпляра *D. marginatus*, собранных в различных районах Астраханской области, но положительных проб не обнаружили. Исходя из этого можно заключить, что *H. marginatum* и *D. marginatus* не являются носителями вируса Бханджа в дельте Волги или их заражённость очень низкая. Вероятно, отсутствие в сборе основного переносчика вируса Бханджа в Европе, клещей *Haemaphysalis* spp., а также незначительное количество протестированных клещей *Rhipicephalus* spp. (14 экземпляров) не дало нам возможности подтвердить молекулярно-генетическими методами циркуляцию вируса Бханджа на обследованной территории.

Два других вируса, которые были исследованы в настоящей работе (Вад Медани и Тамды), широко распространены в Средней Азии и Закавказье и экологически связаны с *Hyalomma* spp. Вирус Вад Медани изолировали от *H. asiaticum* и *H. anatolicum*, а также от других видов клещей. Вирус Тамды и его антигенные варианты многократно изолировали от *Hyalomma* spp., преимущественно *H. asiaticum*, а также от других видов клещей, птиц и людей. Несколько штаммов бы-

ли изолированы от *H. marginatum*, собранных в Средней Азии и Турции. Таким образом, мы предполагали, что ареал вирусов Вад Медани и Тамды совпадает с ареалом его основного переносчика, *Hyalomma* spp., и захватывает дельту Волги. Однако положительных образцов нами не обнаружено.

### Заключение

В настоящей работе показано, что заражённость клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в дельте Волги составила в 2017 г. 1,98 и 0,4% соответственно. Таким образом, вирус Дхори активно циркулирует в природных очагах ККГЛ на обследованной территории. Нами впервые получены количественные показатели соотношения заражённости *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори. В то же время исследованные клещи *H. marginatum* и *D. marginatus*, распространённые в дельте Волги, не являются носителями вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-04-01302а.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8-18, 21, 22, 24, 25, 28, 29 см. REFERENCES)

1. Зими́на Ю.В., Куликова Л.Н., Салько В.Н., Ковтунов А.И. Иксодовые клещи в Астраханской области, их роль в формировании природных очагов и передаче арбовирусов человеку. В кн.: *Вопросы риккетсиологии и вирусологии (Сборник научных трудов)*. Астрахань-Москва; 1996: 58-62.
2. Зими́на Ю.В., Бируля Н.Б., Березин В.В. Материалы зоолого-паразитологической характеристики Крымской геморрагической лихорадки в Астраханской области. В кн.: *Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. Том 7*. М.; 1965: 288-395.
3. Вакалова Е.В., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Куликова Л.Н., Викторова Н.В. Детекция и генетическая характеристика РНК-изолятов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных из клещей *Hyalomma marginatum* в Астраханской области (2016 г.). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(5): 248-53. Doi: <https://doi.org/10.1882/1560-9529-2017-22-5-248-253>
4. Смирнова С.Е., Карань Л.С., Колесникова Н.М., Рыбкин В.С., Платонов А.Е. Распространение вируса Баткен/Дхори в эндемичной по Крымской-Конго геморрагической лихорадке Астраханской области РФ. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2011; (1): 12.
5. Львов Д.Н., Джаркенов А.Ф., Аристова В.А., Ковтунов А.И., Громашевский В.Л., Вышемирский О.И. и др. Изоляция вирусов Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Bunyaviridae, Nairovirus) от зайца (*Lepus europaeus*) и собранных с него клещей *Hyalomma marginatum* в средней зоне дельты Волги, Астраханская область, 2001 г. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(4): 32-6.
6. Бутенко А.М., Чумаков В.М. Выделение нового для СССР арбовируса «Астра» из клещей *H. plumbeum* и комаров *An. hyrcanus* в Астраханской области. В кн.: *Вопросы медицинской вирусологии. Часть 2*. М.; 1971: 11-112.
7. Бутенко А.М., Лещинская Е.В., Семашко И.В., Донец М.А., Мартыанова Л.И. Вирус Дхори — возбудитель заболевания человека, пять случаев лабораторной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 1987; 32(6): 724-9.
8. Азарян А.Р., Гришанова А.П., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Чалов В.В., Инкина Т.Е. и др. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области. В кн.: Бутенко А.М., Баринский И.Ф., Карганова Г.Г., Малеев В.В., Терехин С.А., ред. *Арбовирусы и арбовирусные инфекции. Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и*

*научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции»*. М.: Гриф и К; 2007: 115-9.

20. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Гительман А.К. и др. Генетическая характеристика вируса Вад Медани (WMV - Wad Medani virus) (Reoviridae, Orbivirus), изолированного в Туркмении, Казахстане и Армении из иксодовых клещей *Hyalomma asiaticum* Schulze et Schlottke, 1930 и в Таджикистане из *H. anatolicum* Koch, 1844 (Ixodidae: Hyalomminae). *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(4): 25-30.
23. Львов Д.К. Лихорадка Тамды. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 783-5.
26. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Львов Д.Н. и др. Генетическая характеристика вируса Баткен (BKNV-Batken virus) (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), изолированного от иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 и комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 в Средней Азии. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 33-7.
27. Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Аристова В.А., Гительман А.К. и др. Таксономия ранее негруппированного вируса Тамды (TAMV – Tamdy virus) (Bunyaviridae, Nairovirus), изолированного от иксодовых клещей *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schülce et Schlottke, 1929 (Ixodidae, Hyalomminae) в Средней Азии и Закавказье. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 15-22.

### REFERENCES

1. Zimina Yu.V., Kulikova L.N., Sal'ko V.N., Kovtunov A.I. Ixodid ticks in Astrakhan region, and their role in the forming of natural foci and transmission of arboviruses to human. In: *Issues of Rickettsiology and Virology (Collection of Scientific Papers) [Voprosy rikketsiologii i virusologii (Sbornik nauchnykh trudov)]*. Astrakhan'-Moscow; 1996: 58-62. (in Russian)
2. Zimina Yu.V., Birulya N.B., Berezin V.V. Materials of zoological and parasitological characteristics of the Crimean hemorrhagic fever in the Astrakhan region. In: *Proceedings of Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of AMS USSR. Volume 7 [Trudy Instituta poliomyelita i virusnykh entsefalitov. Tom 7]*. Moscow; 1965: 288-395. (in Russian)
3. Vakalova E.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Kulikova L.N., Viktorova N.V. Detection and genetic characterization of RNA isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from the *Hyalomma marginatum* ticks collected in the Astrakhan region (2016). *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2017; 22(5): 248-53. Doi: <https://doi.org/10.1882/1560-9529-2017-22-5-248-253> (in Russian)
4. Smirnova S.E., Karan' L.S., Kolesnikova N.M., Rybkin V.S., Platonov A.E. Prevalence of Batken/Dhori virus in the Crimean-Congo hemorrhagic fever-endemic Astrakhan Region of the Russian Federation. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2011; (1): 12. (in Russian)
5. L'vov D.N., Dzharkenov A.F., Aristova V.A., Kovtunov A.I., Gromashevskiy V.L., Vyshemirskiy O.I. The isolation of Dhori viruses (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Bunyaviridae, Nairovirus) from the hare (*Lepus europaeus*) and its ticks *Hyalomma marginatum* in the middle zone of the Volga delta, Astrakhan region, 2001. *Voprosy virusologii*. 2002; 47(4): 32-6. (in Russian)
6. Butenko A.M., Chumakov V.M. Isolation of a new for USSR arbovirus "Astra" from ticks *H. plumbeum* and mosquitos *An. hyrcanus* in Astrakhan district. In: *Issues of Medical Virology. Part 2 [Voprosy meditsinskoy virusologii. Chast' 2]*. Moscow; 1971: 11-112. (in Russian)
7. Butenko A.M., Leshchinskaya E.V., Semashko I.V., Donets M.A., Mart'yanova L.I. Dhori virus – a causative agent of human disease, 5 cases of laboratory infection. *Voprosy virusologii*. 1987; 32(6): 724-9. (in Russian)
8. Shah K.V., Work T.H. Bhanja virus: a new arbovirus from ticks *Haemaphysalis intermedia* Warburton and Nuttall, 1909, in Orissa, India. *Indian J. Med. Res.* 1969; 57(5): 793-8.
9. Verani P., Balducci M., Lopes M.C., Sacca G. Isolation of Bhanja virus from *Haemaphysalis* ticks in Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1970; 19(1): 103-5. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.103>

10. Vesenjak-Hirjan J., Calisher C.H., Brudnjak Z., Tovornik D., Skrtic N., Lazuick J.S. Isolation of Bhanja virus from ticks in Yugoslavia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26(5 Pt. 1): 1003-8. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.1003>
11. Ungureanu A., Popovici V., Cătănaş F., Ioniţă I., Tutoveanu A., Safta M. Isolation of Bhanja virus in Romania. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* 1990; 49(2): 139-45.
12. Pavlov P., Rosický B., Hubálek Z., Daniel M., Bárdos V., Minár J., et al. Isolation of Bhanja virus from ticks of the genus *Haemaphysalis* in southeast Bulgaria and presence of antibodies in pastured sheep. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1978; 25(1): 67-73.
13. Filipe A.R., Alves M.J., Karabatsos N., de Matos A.P., Nuncio M.S., Bacellar F. Palma virus, a new bunyaviridae isolated from ticks in Portugal. *Intervirology*. 1994; 37(6): 348-51. Doi: <https://doi.org/10.1159/000150399>
14. Hubálek Z. Geographic distribution of Bhanja virus. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1987; 34(1): 77-86.
15. Lvov D.K., Gromashevsky V.L., Zakaryan V.A., Skvortsova T.M., Berezina L.K., Gofman Y.P., et al. Razdan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from Dermacentor marginatus ticks in Armenia. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 506-8.
16. Mádr V., Hubálek Z., Zendulková D. Experimental infection of sheep with Bhanja virus. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1984; 31(1): 79-84.
17. Calisher C.H., Goodpasture H.C. Human infection with Bhanja virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975; 24(6 Pt. 1): 1040-2. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.1040>
18. Punda V., Ropac D., Vesenjak-Hirjan J. Incidence of hemagglutination-inhibiting antibodies for Bhanja virus in humans along the north-west border of Yugoslavia. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A*. 1987; 265(1-2): 227-34. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(87\)80170-0](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(87)80170-0)
19. Azaryan A.R., Grishanova A.P., Butenko A.M., Larichev V.F., Chalov V.V., Inkina T.E., et al. Serological diagnostics of arboviral infections in Astrakhan region. In: Butenko A.M., Barinskiy I.F., Karganova G.G., Maleev V.V., Terekhin S.A., eds. *Arboviruses and arbovirus infections. Materials of the enlarged plenum of the «Arboviruses» Problem Commission and the scientific-practical conference «Arboviruses and Arbovirus Infections» [Arbovirusy i arbovirusnye infektsii. Materialy rasshirennogo plenuma problemnoy komissii «Arbovirusy» i nauchno-prakticheskoy konferentsii «Arbovirusy i arbovirusnye infektsii»]*. Moscow: Grif i K; 2007: 115-9. (in Russian)
20. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Gitel'man A.K., et al. Genetic characterization of the Wad Medani virus (WMV) (Reoviridae, Orbivirus), isolated from the ticks *Hyalomma asiaticum* Schulze et Schlottko, 1930 (Ixodidae: Hyalomminae) in Turkmenistan, Kazakhstan, and Armenia and from the ticks *H. anatolicum* Koch, 1844 in Tajikistan. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(4): 25-30. (in Russian)
21. Lvov D.K., Sidorova G.A., Gromashevsky V.L., Kurbanov M., Skvortsova L.M., Gofman Y.P., et al. Virus "Tamdy" – a new arbovirus, isolated in the Uzbee S.S.R. and Turkmen S.S.R. from ticks *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schullee et Schlottko, 1929, and *Hyalomma plumbeum plumbeum* Panzer, 1796. *Arch. Virol.* 1976; 51(1-2): 15-21. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01317830>
22. Brinkmann A., Dincer E., Polat C., Hekimoglu O., Hacıoglu S., Foldes K., et al. A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5): 1173-83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.017>
23. L'vov D.K. Tamdy fever. In: L'vov D.K., ed. *Handbook of Virology. Viruses and Viral Infection of Human and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 783-5. (in Russian)
24. Liu X., Zhang X., Wang Z., Dong Z., Xie S., Jiang M., et al. A Tentative Tamdy Orthonairovirus Related to Febrile Illness in North-western China. *Clin. Infect. Dis.* 2019; pii: ciz602. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz602>
25. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9. Doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
26. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., L'vov D.N., et al. Genetic characterization of the Batken virus (BKNV) (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) isolated from the Ixodidae ticks *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 and the mosquitoes *Aedes caspius* Pallas, 1771, as well as the *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 in the Central Asia. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 33-7. (in Russian)
27. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Aristova V.A., Gitel'man A.K., et al. Taxonomy of previously unclassified Tamdy virus (TAMV) (Bunyaviridae, Nairovirus) isolated from the *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schulze et Schlottko, 1929 (Ixodidae, Hyalomminae) in the Middle East and transcaucasia. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 15-22. (in Russian)
28. Lvov D.K., Karas F.R., Tsyarkin Y.M., Vargina S.G., Timofeev E.M., Osipova N.Z., et al. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitoes in Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1974; 44(1): 70-3. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01242183>
29. Lukashev A.N., Deviatkin A.A. Phylogenetics of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in South Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 59: 23-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.016>

Поступила 21.11.19

Принята в печать 28.11.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Сенюта Н.Б.<sup>1</sup>, Смирнова К.В.<sup>1,2</sup>, Кондратова В.Н.<sup>1</sup>, Игнатова А.В.<sup>1</sup>, Мудунов А.М.<sup>1</sup>, Душенькина Т.Е.<sup>1</sup>, Лихтенштейн А.В.<sup>1</sup>, Гурцевич В.Э.<sup>1</sup>

## Диагностика рака носоглотки с помощью серологических и молекулярных маркёров вируса Эпштейна-Барр (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4) в случаях невыявленного первичного очага опухоли

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 г. Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997 г. Москва, Россия

**Введение.** Причинами поздней диагностики рака носоглотки (РНГ) являются длительное бессимптомное течение патологического процесса, анатомическое строение носоглотки, часто маленькое, визуально и эндоскопически не обнаруживаемое новообразование и другие факторы. При этом доказано, что этиологическим агентом при наиболее часто встречающемся недифференцированном неороговевающем гистологическом типе РНГ (нРНГ) является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ).

**Целью** работы стала оценка значимости диагностических маркёров ВЭБ (титров гуморальных антител к вирусу и концентрации вирусной ДНК в плазме) для диагностики нРНГ в группе больных с метастатическим поражением лимфатических узлов шеи без выявленного первичного очага опухоли.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служила плазма крови 83 больных с метастатическим поражением шейных лимфатических узлов и не установленной локализацией первичной опухоли. Плазму от указанных больных тестировали на содержание и титры IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному антигену ВЭБ и концентрацию вирусной ДНК.

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что совместное тестирование плазмы крови на ВЭБ-специфические антитела и вирусную нагрузку является полезным инструментом для предварительного скрининга больных на нРНГ, что подтверждается данными последующих морфологических и инструментальных исследований, устанавливающих окончательный диагноз. На нескольких примерах показано, что концентрация вирусной ДНК в плазме крови больных нРНГ отражает эффект проведённой терапии и прогноз болезни: ремиссию, стабилизацию опухолевого процесса, рецидив или метастазирование.

**Заключение.** Несмотря на то, что титры вирус-специфических антител менее точно, чем концентрация вирусной ДНК в плазме, отражают клинические проявления болезни, серологические маркёры чрезвычайно важны для предварительной диагностики нРНГ в случаях невыявленного первичного очага опухоли. Они также могут использоваться для первичного скрининга этого новообразования среди лиц из группы риска.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна-Барр; титры антител; концентрация ДНК вируса Эпштейна-Барр в плазме, больные с не выявленным первичным очагом опухоли.

**Для цитирования:** Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Кондратова В.Н., Игнатова А.В., Мудунов А.М., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э. Диагностика рака носоглотки с помощью серологических и молекулярных маркёров вируса Эпштейна-Барр (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4) в случаях невыявленного первичного очага опухоли. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 229-237.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-229-237>

### Информация об авторах:

Сенюта Н.Б., <http://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Смирнова К.В., <http://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

Кондратова В.Н., <http://orcid.org/0000-0003-0614-8789>

Игнатова А.В., <http://orcid.org/0000-0002-6796-0968>

Мудунов А.М., <http://orcid.org/0000-0002-0918-3857>

Душенькина Т.Е., <http://orcid.org/0000-0002-3066-1606>

Лихтенштейн А.В., <http://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

Гурцевич В.Э., <http://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

**Для корреспонденции:** Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 г. Москва; <http://orcid.org/0000-0003-1840-4364>.

E-mail: [gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru](mailto:gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru)

Senyuta N.B.<sup>1</sup>, Smirnova K.V.<sup>1,2</sup>, Kondratova V.N.<sup>1</sup>, Ignatova A.V.<sup>1</sup>, Mudunov A.M.<sup>1</sup>, Dushenkina T.E.<sup>1</sup>, Liechtenstein A.V.<sup>1</sup>, Gurtsevich V.E.<sup>1</sup>

## Diagnostics of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4) serological and molecular markers in cases of undetected primary tumor location

<sup>1</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia

**Introduction.** The reasons of late diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) are the long asymptomatic course of the pathological process, the anatomical structure of the nasopharynx, often small, visually and endoscopically undetectable tumor and other factors. It is proved that the Epstein-Barr virus (EBV) is an etiological agent in the most common undifferentiated non-keratinizing histological type of NPC (uNPC).

**The aim** of the work was to assess the significance of diagnostic markers of EBV (titers of humoral antibodies to the virus and the concentration of viral DNA in plasma) for the diagnosis of uNPC in a group of patients with metastatic lesions of the cervical lymph nodes without an identified localization of the primary tumor focus.

**Material and methods.** The material for the study was blood plasma of 83 patients with metastatic lesions of the cervical lymph nodes and not established localization of the primary tumor. Plasma samples were tested for the anti-EBV IgG and IgA antibody content and titers and the concentration of viral DNA.

**Results and discussion.** The data obtained indicate that the parallel testing of blood plasma for EBV-specific antibodies and viral load is a useful tool for preliminary screening of uNPC patients. The final diagnosis is confirmed by the data of subsequent morphological and instrumental studies. Several examples also show that the concentration of viral DNA in the blood plasma of patients with uNPC reflects the effect of the therapy and the prognosis of the disease: remission, stabilization of the tumor process, relapse or metastasis.

**Conclusion.** Although the titers of virus-specific antibodies are found to reflect clinical manifestations of the disease less accurately than the plasma concentrations of viral DNA, serological markers are extremely important for the preliminary diagnostics of uNPC in cases of undetected primary tumor location. They are also useful for primary screening of this neoplasm among individuals at risk.

**Keywords:** Epstein-Barr virus (EBV); antibody titers; EBV DNA concentration in blood plasma; patients with undetected primary tumor focus.

**For citation:** Senyuta N.B., Smirnova K.V., Kondratova V.N., Ignatova A.V., Mudunov A.M., Dushenkina T.E., Liechtenstein A.V., Gurtsevich V.E. Diagnostics of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus (*Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4*) serological and molecular markers in cases of undetected primary tumor location. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 229-237. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-229-237>

**For correspondence:** Vladimir E. Gurtsevitch, Dr. Med. Sci., leading researcher of the laboratory of viral carcinogenesis of the N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russia; <http://orcid.org/0000-0003-1840-4364>.

E-mail: [gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru](mailto:gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru)

#### Information about authors:

Senyuta N.B., <http://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Smirnova K.V., <http://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

Kondratova V.N., <http://orcid.org/0000-0003-0614-8789>

Ignatova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-6796-0968>

Mudunov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0918-3857>

Dushenkina T.E., <http://orcid.org/0000-0002-3066-1606>

Lichtenstein A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

Gurtsevitch E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

**Acknowledgments.** The study was conducted under the auspices of an experimental government task of the Ministry of Health of the Russian Federation and is coordinated by the Center for Strategic Planning and Risk Management of Biomedical Health of the Ministry of Health of Russia, as well as with financial support from a grant from Russian Foundation for Basic Research (project № 18-015-00505A).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 13 June 2019

Accepted 28 November 2019

## Введение

Известно, что вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) семейства герпесвирусов инфицировано более 90% взрослого населения земли. Первичное инфицирование обычно происходит в раннем детском возрасте и осуществляется главным образом через слюну или заражённые слюной предметы. Хотя первая встреча с ВЭБ обычно протекает бессимптомно, с данным вирусом связывают развитие целого ряда доброкачественных и злокачественных новообразований [1]. К их числу относится и рак носоглотки (РНГ) этиологическая роль ВЭБ в возникновении которого считается доказанной. Согласно классификации ВОЗ, выделяют три гистологических типа РНГ: плоскоклеточный ороговевающий (keratinizing squamous cell carcinoma), плоскоклеточный неороговевающий рак (non-keratinizing squamous carcinoma) и базалоидный плоскоклеточный рак. К плоскоклеточному неороговевающему носоглотки относят два подтипа: недифференцированный неороговевающий

(nondifferentiated non-keratinizing carcinoma) (нРНГ) и дифференцированный ороговевающий (differentiated keratinizing carcinoma) рак, клинически и прогностически не отличающиеся друг от друга [2]. Для нРНГ характерна обильная лимфоидная инфильтрация, состоящая из лимфоцитов, гистиоцитов, эозинофилов и других реактивных клеток. Именно этот морфологический вариант РНГ (нРНГ) ассоциирован с ВЭБ вне зависимости от географического происхождения и этнической принадлежности больного [3]. Плоскоклеточный ороговевающий и плоскоклеточный базалоидный рак с ВЭБ не ассоциированы.

В пользу этиологической роли ВЭБ в возникновении нРНГ свидетельствуют: а) наличие моноклональных плазмид ВЭБ и продуктов вирусных генов практически во всех опухолевых клетках; это указывает на то, что опухоли являются результатом клональной пролиферации одной клетки, изначально инфицированной вирусом [4]; б) отсутствие вирусной информации в незлокачественных эпителиальных клетках

носоглотки [5]; в) обнаружение повышенных титров IgA-антител к антигенам вируса, являющихся высоко-специфичными маркерами для скрининга нРНГ в эндемичных районах [6]; г) корреляция экспрессии вирусных белков, таких как латентные мембранные белки 1 и 2 (LMP1, LMP2) и ядерные белки EBNA1 и EBNA2, с прогрессированием опухоли [7].

Во всём мире диагностируют нРНГ, но с различной частотой, поскольку заболеваемость этой формой опухоли характеризуется географической и этнической вариабельностью [8]. Самая высокая распространённость РНГ в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии (25–30 случаев на 100 тыс. человек в год), более низкая – среди арабов Северной Африки, коренных народов Гренландии и Аляски [9]. В европейских странах РНГ регистрируют редко, менее 0,5 случая на 100 тыс. населения в год. Примерно с такой же частотой РНГ встречается на территории бывшего СССР, включая Россию, где в структуре злокачественных новообразований в 2017 г. опухоли носоглотки у мужчин составляли 0,14%, а у женщин – 0,06% [10].

У большинства инфицированных в течение всей жизни лиц ВЭБ находится в латентном состоянии и лишь у небольшой части развивается опухоль. Отсюда следует вывод, что ВЭБ не является единственной и достаточной причиной для инициации канцерогенеза. Воздействие окружающей среды и/или генетические факторы риска, в частности определённый HLA гаплотип, также играют роль в патогенезе нРНГ [11, 12]. Факторы, которые могут потенциально способствовать проявлению онкогенных потенциалов ВЭБ, включают возраст, диету, иммунный статус во время первичной инфекции ВЭБ и т.д. [13, 14]. В этом плане интересно отметить, что в районах с высокой заболеваемостью нРНГ (например, в Гонконге, Тайване и южных провинциях Китая) примерно 60% детей инфицированы в возрасте двух лет, 80% в возрасте шести лет и практически 100% в возрасте 10 лет [15]. Известно, что у детей раннего возраста (до 14 лет) иммунитет ещё окончательно не сформирован и очень раннее воздействие ВЭБ и других канцерогенов на организм может играть важную роль в патогенезе нРНГ. В западноевропейских странах и в США, где низкий уровень заболеваемости этой формой опухоли, первичное инфицирование ВЭБ детей происходит относительно поздно [15].

К установленным факторам риска также относятся случаи нРНГ в семейном анамнезе, частое использование в пищу консервированной солью рыбы, редкое потребление свежих овощей и фруктов, курение и некоторые генотипы HLA [12, 16]. Другие потенциальные факторы риска включают доминирование в пищевом рационе любых консервированных продуктов [17], хронические заболевания дыхательных путей, генетические полиморфизмы в цитохроме P450 2E1 и глутатион-S-трансферазе M1 [18, 19]. К возможным факторам риска причисляют использование фитотерапии на основе трав, содержащих форболовые эфиры, являющиеся опухолевыми промоторами, а также

профессиональное воздействие пыли, формальдегида и никеля [20, 21].

Как было указано выше, для больных нРНГ характерны повышенные титры IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ [22], которые начинают достигать высоких уровней задолго до установления диагноза [23]. Это дало основание предположить, что ВЭБ может участвовать в патогенезе нРНГ ещё в доклинической фазе болезни. При этом обнаружение антител IgA к вирусному капсидному антигену (ВКА) широко используется для скрининга нРНГ в эндемичных по этому заболеванию регионах Китая и странах Юго-Восточной Азии [24].

В ряде исследований установлено, что так называемый метод жидкостной биопсии, базирующийся на определении количества копий ДНК ВЭБ в плазме крови, не только высокоэффективен для диагностики нРНГ, но и полезен для выявления остаточных (клинически скрытых) опухолей после химиолучевой терапии [25], а также для оценки эффективности лечения [26]. Однако если повышенные уровни ДНК ВЭБ в плазме тесно связаны с размером опухоли, активностью её роста и ответом на химиотерапию [27], то уровни IgA-антител к ВКА, как правило, ассоциируются с повышенным риском возникновения РНГ и имеют диагностическое значение [28].

Необходимость своевременной диагностики нРНГ представляется крайне актуальной задачей, о чём свидетельствует тот факт, что у 70–80% поступающих в клинику больных диагностируют III–IV стадии болезни, а срок установления окончательного диагноза составляет в среднем 7 мес [29]. Сложность диагностики РНГ заключается не только в локализации опухоли в труднодоступном для визуализации анатомическом месте, но и в особенности клинического проявления болезни – метастазировании опухоли в лимфатические узлы шеи без клинически определяемого первичного очага опухоли в носоглотке. Однако метастазы в лимфатических узлах шеи могут иметь различное органное происхождение. В этом случае до использования современных методов визуализации опухоли, таких как КТ и МРТ, дифференциальную диагностику нРНГ от других патологий в области головы и шеи, симулирующих РНГ, логично начинать с использования вирусных маркеров ВЭБ: с определения титров ВЭБ-специфических антител и концентрации вирусной ДНК в плазме крови больных.

Исходя из вышеизложенного **целью** работы стала оценка значимости диагностических маркеров ВЭБ (титров гуморальных антител к вирусу и концентрации вирусной ДНК в плазме) для диагностики нРНГ в группе больных с метастатическим поражением лимфатических узлов шеи без выявленного первичного очага опухоли. Исследование впервые проводили в России – не эндемичном для этого новообразования регионе.

### Материал и методы

*Объект исследования.* Изучали образцы плазмы крови от 83 больных, поступивших в ФГБУ «НМИЦ

онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с метастазами в области шеи без первично выявленного очага опухоли. Соотношение представителей женского и мужского пола было 1 : 1, а средний возраст составил 45,2 года. После вирусологических исследований больные были обследованы клинически; носоглотка осмотрена эндоскопически, а биопсийный материал из носоглотки или метастатически поражённых лимфатических узлов верифицирован гистологически, в соответствии с классификацией ВОЗ [2]. Контрольная группа состояла из 8 больных с окончательным диагнозом «другие опухоли», не связанные с РНГ и не ассоциированные с ВЭБ.

Данное исследование, в которое вошли больные и здоровые лица по собственному согласию в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

*Серологический тест на антитела к вирусу Эпштейна-Барр.* Титры IgG- и IgA-антител к ВКА и раннему (РА) антигенам ВЭБ определяли в плазме крови больных методом непрямой иммунофлюоресценции, условия постановки которой и учёт результатов были описаны ранее [22]. Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений (СГЗ) и медиан (М).

*Количественное определение числа копий вирусной ДНК.* Число копий ДНК ВЭБ в образцах плазмы крови обследуемых больных и 200 доноров крови определяли посредством полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих два интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК – 1 копия вирусной ДНК [30]. Для ПЦР-РВ использовали праймеры к фрагменту размером 76 пар нуклеотидов в области BamHI-W ДНК ВЭБ (GenBank accession number V01555): sense primer – W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC); antisense primer – W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG); флюоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACASTACACACACCCACCCGTCTC-RTQ1). Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси («Синтол», Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флюорес-

центного зонда, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ каждого дНТФ, 1 ед. Таq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере TE (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали два негативных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95 °С; 40 циклов 15 с при температуре 95 °С и 30 с при температуре 56,5 °С. Данные ПЦР-РВ анализировали при помощи программы Bio-Rad CFX manager. Базируясь на результатах тестирования здоровых доноров крови, 100 копий ДНК ВЭБ в 1 мл плазмы было принято в качестве порогового значения при диагностике нРНГ.

### Результаты

Для диагностики нРНГ с помощью серологического теста использовали ранее разработанное в лаборатории «Решающее правило» (РП), основанное на информативности различных серологических маркёров ВЭБ для диагностики нРНГ. Согласно РП, наиболее информативны сочетания определённых титров IgG- и IgA-антител к ВКА и IgG-антител к РА вируса. С помощью многофакторного анализа были определены оптимальные сочетания этих трёх серологических маркёров, позволяющие по характеру иммунного ответа к указанным антигенам диагностировать нРНГ с достоверностью 90% [31].

Образцы плазмы крови больных с увеличенными шейными лимфатическими узлами и неизвестной локализацией первичного очага опухоли предварительно тестировали на наличие вирус-специфических антител. Обследованные больные были разделены на две группы: с высокими, характерными для нРНГ титрами ВЭБ-специфических антител, и с низкими титрами, не характерными для этой патологии (табл. 1).

Обе группы больных в дальнейшем проходили углублённое клиническое обследование. Данные серологического анализа, подтверждающие или отвергающие нРНГ на основании РП, сопоставляли с результатами гистологического исследования и заключительного клинического диагноза и, таким образом, определяли диагностическую ценность ВЭБ-специфических антител (табл. 2).

Проведённые исследования показали, что у 28 из 33 больных с высокими титрами антител к ВЭБ, характерными для нРНГ, диагноз нРНГ был подтверждён гистологически, т. е. в 84,8% случаев серологический

Таблица 1

Результаты тестирования образцов плазмы больных с невыявленным первичным очагом опухоли в двух группах больных с контрастным серологическим ответом к антигенам вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ)

Группа больных	Возраст, годы	СГЗ титров антител к ВЭБ							
		IgG				IgA			
		ВКА	М	РА	М	ВКА	М	РА	М
1-я (n = 33)	42,2	518,7	320	141,1	160	92,7	80	48,4	40
2-я (n = 50)	48,7	45,2	80	1,9	1	1,0	1	1,0	1,0

Примечание. СГЗ – средние геометрические значения титров антител; ВКА – вирусный капсидный антиген ВЭБ; РА – ранний антиген ВЭБ; М – медиана значений титров антител; 1-я группа – случаи невыявленного первичного очага опухоли с высокими титрами антител, характерными для неороговевающего рака носоглотки; 2-я группа – случаи невыявленного первичного очага опухоли с низкими титрами антител, нехарактерными для неороговевающего рака носоглотки.

диагноз нРНГ совпал с гистологическим, а в 15,2% случаев оказался ложнопозитивным. В группе больных с низкими титрами вирус-специфических антител ложнопозитивный диагноз нРНГ был установлен у 11 (22,0%), а отвергнут у 39 (78%) из 50 обследованных больных. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности серологических маркёров ВЭБ для диагностики нРНГ в сложной для диагностики группе больных с невыявленным первичным очагом опухоли.

Особый интерес представляет сравнительный анализ диагностической ценности серологических и вирусных маркёров в виде концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови трёх групп больных без выявленного первичного очага опухоли. Первая группа состояла из больных с подтверждённым гистологическим диагнозом нРНГ, ассоциированного с ВЭБ; 2-я группа – из больных с установленным гистологическим диагнозом ороговевающего плоскоклеточного рака носоглотки, как известно, не ассоциированного с вирусом, а 3-я – из больных с онкопатологией, не связанной с РНГ и, соответственно, с ВЭБ (табл. 3).

В 1-й группе больных результат серологического тестирования совпал с результатом гистологического исследования в 76,9% случаев, а с показателями концентрации вирусной ДНК – в 42,3% случаев. При этом диагностика нРНГ при использовании комбинации серологических и вирусологических маркёров совпала с гистологическим диагнозом нРНГ также в

76,9% случаев. Этот факт подтверждает достаточно высокую эффективность серологических и вирусных маркёров ВЭБ для диагностики нРНГ. Низкая нагрузка ДНК ВЭБ в плазме крови больных этой группы остаётся невыясненной.

Во 2-й группе больных (с гистологическим вариантом опухоли, не ассоциированной с ВЭБ) число серологически негативных случаев составило 92,3%, а число случаев с фоновым содержанием ДНК ВЭБ (< 100 копий/мл) – 69,2%. Их общая диагностическая эффективность равнялась 100%, т. е. ложнопозитивные случаи в этой группе больных не выявлены.

В 3-й группе онкологических больных (с диагнозом, не относящимся ни к одному гистологическому варианту РНГ) число серологически негативных случаев составило 75,0%, а случаев, не превышающих фоновые значения концентрации вирусной ДНК в плазме, – 87,5%. Общая диагностическая значимость обоих маркёров составила 85,7%. Эти результаты свидетельствуют в пользу достаточно высокой эффективности выявления нРНГ с помощью обоих маркёров ВЭБ в смешанной группе больных с невыявленным очагом опухоли.

Таким образом, наше исследование, проведённое в неэндемичном для РНГ регионе, свидетельствуют о том, что тестирование больных на ВЭБ-специфические антитела и концентрацию вирусной ДНК в плазме крови может оказаться полезным инструментом скрининга для раннего выявления нРНГ, особенно в

Таблица 2

**Значимость титров антител к вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ) для диагностики плоскоклеточного неороговевающего рака носоглотки (нРНГ) у больных с невыявленным первичным очагом опухоли**

Группа больных	Диагноз нРНГ, по данным ВЭБ-специфических титров антител	Диагноз нРНГ, по данным гистологического исследования	Количество совпадений серологического и гистологического диагнозов, %	Количество несовпадений серологического и гистологического диагнозов, %
1-я (n = 33)	33	28	84,8*	15,2
2-я (n = 50)	0	11	78,0	22,0

Примечание. \* Обнаруженные случаи лимфомы Ходжкина и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с высокими титрами антител к вирусу Эпштейна–Барр были исключены из группы больных с диагнозом «неороговевающий рак носоглотки»; 1-я группа – случаи невыявленного первичного очага опухоли с высокими титрами антител, характерными для неороговевающего рака носоглотки; 2-я группа – случаи невыявленного первичного очага опухоли с низкими титрами антител, нехарактерными для неороговевающего рака носоглотки.

Таблица 3

**Диагностическая ценность титров антител к вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ) и показателей концентрации вирусной ДНК в плазме крови больных с невыявленным первичным очагом опухоли для диагностики плоскоклеточного неороговевающего рака носоглотки (нРНГ)**

Группа больных	Серологический диагноз нРНГ		Количество совпадений серологического и гистологического диагнозов, %*	Диагноз нРНГ, по данным концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови больных		Количество совпадений показаний концентрации ДНК ВЭБ и гистологического диагноза, %	Количество совпадений серологического диагноза с данными концентрации ДНК ВЭБ, %	Общая чувствительность вирусных маркеров для диагностики нРНГ
	положительный	отрицательный		положительный	отрицательный			
1-я (n = 26)	20	6	76,9	11	15	42,3	68,8	76,9
2-я (n = 13)	1	12	92,3	4	9	69,2	75,0	100
3-я (n = 8)	2	6	75,0	1	7	87,5	85,7	85,7

Примечание. 1-я группа – больные с невыявленным первичным очагом опухоли с окончательным диагнозом плоскоклеточного неороговевающего рака носоглотки, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр; 2-я группа – больные с невыявленным первичным очагом опухоли с окончательным диагнозом плоскоклеточного рака носоглотки, не ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр; 3-я группа – больные с окончательным диагнозом «другие опухоли», не связанные с раком носоглотки и не ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр.

случае метастатического поражения лимфатических узлов из невыявленного первичного очага. Однако следует отметить, что ряд несовпадений значений вирусных маркёров с окончательным диагнозом, установленным на основе клинико-морфологических исследований, может быть обусловлен наличием в изучаемой группе больных патологий, не относящихся к нРНГ, но ассоциированных с вирусом. К таким патологиям относятся инфекционный мононуклеоз, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, диффузная В-крупноклеточная лимфома и ряд других, снижающих точность диагностики нРНГ с помощью маркёров ВЭБ.

Что касается клинической значимости маркёров вируса, то она становится очевидной при индивидуальном мониторинге больных нРНГ на вирусную нагрузку в плазме, с одной стороны, и на IgG- и IgA-антитела к ВКА ВЭБ, с другой. Поведение этих маркёров у одного и того же больного, отражающее различные эффекты терапии у больных в состоянии ремиссии и рецидива опухолевого процесса, представлены на рис. 1 (а, б) и 2 (а, б). В частности, на рис. 1а видно, что при поступлении в клинику в плазме крови одного из двух больных нРНГ группы лиц с клинической ремиссией наблюдали высокую концентрацию ДНК ВЭБ (17 680 копий/мл). Этот показатель снизился до 444 копий после первого курса химиолучевой терапии, соответствуя стабилизации опухолевого процесса, и продолжал в дальнейшем снижаться (153 копии), но повысился перед вторым

курсом химиолучевой терапии (972 копии/мл), после которого концентрация вирусной ДНК снизилась до фоновых значений (15 копий/мл). После второго курса химиотерапии больной уже находился в клинической ремиссии. Уровни ВКА/IgG- и ВКА/IgA-антител у этого больного в целом соответствовали динамике его перехода в ремиссию, но реакция антител на вирусные антигены из-за инерции иммунного механизма была несколько отсрочена и не всегда следовала за динамикой вирусной нагрузки в плазме. Действительно, высокие титры IgG- и IgA-антител к ВКА, выявленные при поступлении больного (1 : 640 и 1 : 320 соответственно), после первого курса терапии с некоторым опозданием стали снижаться (1 : 80 и 1 : 40 соответственно). Но в состоянии ремиссии, сопровождавшейся падением вирусной нагрузки в плазме, у больного после второго курса химиотерапии был зарегистрирован некоторый подъём IgG- и IgA-антител к ВКА (1 : 320 и 1 : 80 соответственно).

Аналогичное поведение вирусных маркёров наблюдали и у другого больного с положительным ответом на терапию (см. рис. 1б). Высокая концентрация вирусной ДНК, обнаруженная до лечения (1197 копий/мл) и многократно возросшая после первого курса химиотерапии (13 608 копий/мл), возможно, в результате разрушения основной массы опухолевых клеток и высвобождения вирусной ДНК, после второго курса химиотерапии была существенно снижена до 482 копий/мл. На этом этапе у больного была отмечена полная клиническая ремиссия. Титры IgG- и

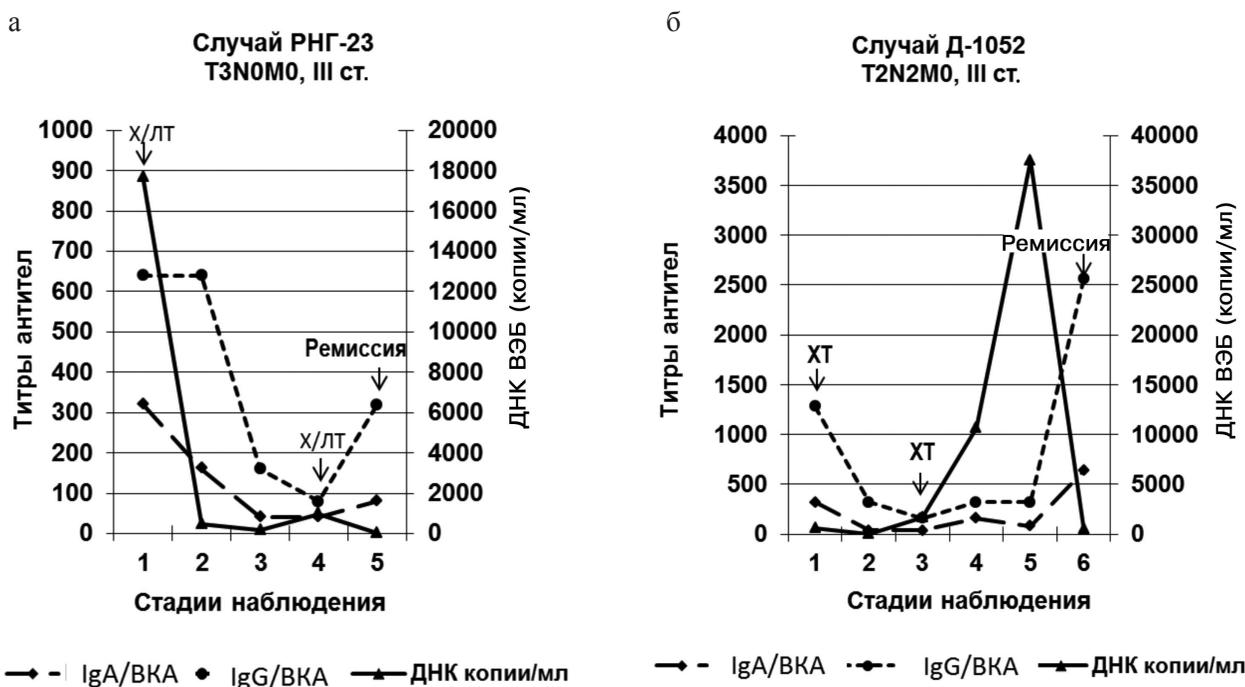


Рис. 1. Титры антител к вирусу Эпштейна–Барр и ДНК вируса в плазме крови у больных раком носоглотки в состоянии ремиссии. IgG/ВКА и IgA/ВКА – титры IgG- и IgA-антител к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр (левая шкала ординат); для демонстрации нагрузки ДНК вируса Эпштейна–Барр в виде числа копий ДНК в 1 мл плазмы крови использовали правую шкалу ординат. Обозначения в верхней части рисунков: коды пациентов, возраст, параметры опухоли в соответствии с классификацией TNM и стадия заболевания; ХТ – химиотерапия, Х/ЛТ – химиолучевая терапия.

IgA-антител к ВКА, будучи высокими при первичном обследовании больного (1 : 320 и 1 : 80 соответственно), после второго курса терапии снизились, особенно IgA-антител к ВКА (1 : 160 и 1 : 10 соответственно).

У двух больных с признаками рецидива опухоли наблюдали иную картину. Как показано на рис. 2а, нагрузка ДНК ВЭБ в плазме крови у больного до начала лечения была повышенной (639 копий/1 мл) и сопровождалась высокими IgG/ВКА- и IgA/ВКА-титрами антител (1 : 1280 и 1 : 320). После первого курса химиотерапии концентрация ДНК ВЭБ в его плазме крови существенно снизилась (16 копий/мл), что коррелировало с уменьшением размеров первичной опухоли и шейных лимфатических узлов и со снижением титров вирус-специфических антител (1 : 320 и 1 : 40 соответственно). После второго курса химиотерапии вирусная нагрузка у этого больного стала нарастать (1679 и 10 660 копий/мл) и после проведения полихимиотерапии достигла максимального значения (37 511 копий/мл). Клинически положительный ответ на первый курс химиотерапии, сопровождавшийся некоторой стабилизацией опухолевого процесса, сменился рецидивом болезни, тяжесть которой прогрессивно нарастала, что сопровождалось постепенным ростом титров IgG/ВКА- и IgA/ВКА-антител. В предтерминальной стадии концентрация вирусной ДНК у больного по непонятной нам причине существенно снизилась до 583 копий/мл, но титры антител достигли своих наивысших значений (1 : 2560 и 1 : 640 соответственно).

У второго больного (см. рис. 2б) выявленные при поступлении концентрация вирусной ДНК (21890 копий/мл) и титры IgG/ВКА и IgA/ВКА антител (1 : 40 и 1 : 80 соответственно) также были высокими. Проведение двух курсов химиотерапии привело к ремиссии опухолевого процесса: уменьшению размеров опухоли в носоглотке и шейных лимфатических узлов, что сопровождалось полным исчезновением вирусной ДНК в плазме крови и некоторым ослаблением гуморального ответа на вирус (1 : 160 и 1 : 40). Однако при поступлении в стационар через 12 мес у больного диагностировали резкое прогрессирование опухолевого процесса, сопровождающегося тотальным метастатическим поражением костей скелета, чрезвычайно высокой концентрацией вирусной ДНК в плазме (33 217 копий/мл) и усилением гуморального ответа к вирусу (1 : 640 и 1 : 160 соответственно). Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о несомненной клинической значимости вирусных маркеров для мониторинга нРНГ, хотя серологический ответ к ВЭБ, в отличие от вирусной нагрузки в плазме, не всегда и не у каждого больного строго отражал клинические проявления болезни.

### Обсуждение

Благодаря многочисленным исследованиям этиологическая роль ВЭБ в развитии наиболее часто встречающегося нРНГ не вызывает сомнения. Ввиду клинических особенностей РНГ, раннего метастазирования в лимфатические узлы шеи и часто без визуально и

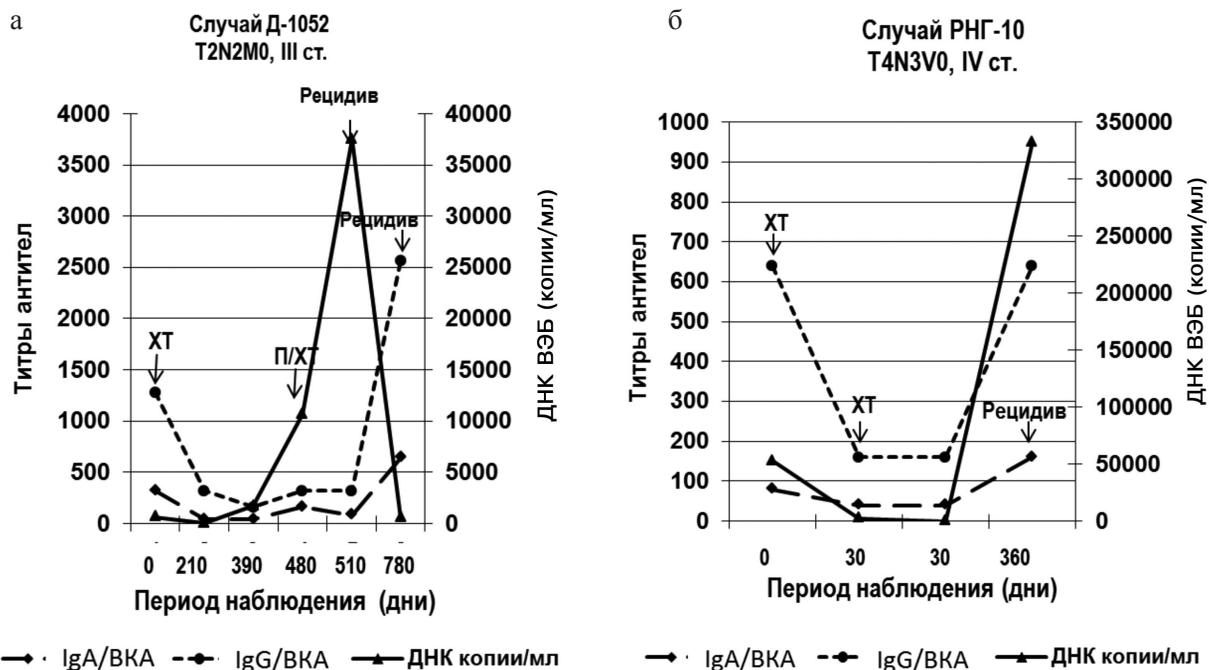


Рис. 2. Титры антител к вирусу Эпштейна–Барр и ДНК вируса в плазме крови у больных раком носоглотки в состоянии рецидива. IgG/ВКА и IgA/ВКА – титры IgG- и IgA-антител против капсидного антигена вируса Эпштейна–Барр (левая шкала ординат); для демонстрации нагрузки ДНК вируса Эпштейна–Барр в виде числа копий ДНК в 1 мл плазмы крови использовали правую шкалу ординат. Обозначения в верхней части рисунков: коды пациентов, возраст, параметры опухоли в соответствии с классификацией TNM и стадия заболевания. ХТ – химиотерапия, П/ХТ – полихимиотерапия.

эндоскопически выявляемой патологии в носоглотке, диагностика этого новообразования бывает чрезвычайно затруднена и даже ошибочна, особенно у больных с невыявленным первичным очагом опухоли. В последние годы к серологическим маркерам вируса (титрам антител к IgG/ВКА и IgA/ВКА) добавился метод количественной флуоресцентной ПЦР-РВ для определения концентрации вирусной ДНК в плазме крови больных. Совместное использование этого метода и указанного выше серологического теста может стать эффективным инструментом для диагностики, оценки клинического статуса и эффективности терапии у больных нРНГ [32].

В эндемичных по нРНГ регионах обнаружено, что лица с высокими титрами ВЭБ-специфических антител составляют группу повышенного риска развития этой формы опухоли, тогда как показатели концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови более четко, чем антитела, коррелируют с проявлениями болезни [33]. Однако клиническая целесообразность использования этих вирусных маркеров в эндемичных регионах у больных с метастатическими поражениями шейных лимфатических узлов без выявленного первичного очага опухоли оставалась практически неизученной.

Расхождения между показателями двух вирусологических маркеров, вероятно, можно объяснить различными механизмами их формирования. Так, титры антител IgG/ВКА и IgA/ВКА появляются в результате несколько замедленного иммунного ответа организма на белки литического репликативного цикла ВЭБ, а вирусная ДНК в плазме крови и её концентрация, вероятно, свидетельствуют об апоптотическом процессе опухолевых клеток, содержащих генетическую информацию вируса [34]. Важно отметить, что другие злокачественные и доброкачественные новообразования, ассоциированные с ВЭБ, характеризующиеся, как и нРНГ, увеличением шейных лимфатических узлов, также могут быть выявлены с помощью этих маркеров (например, инфекционный мононуклеоз, лимфома Ходжкина, ряд неходжкинских лимфом и т.д.).

В то время как серологические маркеры и вирусная ДНК в плазме крови обладают примерно одинаковой чувствительностью в плане диагностики нРНГ, копии ДНК ВЭБ в плазме больного точнее и быстрее реагируют на различные варианты клинического течения болезни. Из этого следует, что тест на IgG/IgA-антитела к ВКА как технический несложный метод может быть рекомендован для первичной и ранней диагностики или скрининга популяции на предмет выявления больных нРНГ. Тогда как концентрацию ДНК ВЭБ в плазме больного более рационально определять для мониторинга клинического течения и оценки эффективности проводимой терапии.

Совсем недавно исследования в Южном Китае показали, что комбинация EBNA1/IgA- и IgA/ВКА-антител, измеренная с помощью ELISA, имеет более высокую диагностическую ценность, чем используемое нами иммунофлуоресцентное тестирование на IgG/IgA-антитела к ВКА. Согласно мнению авторов, предложенная реакция обладает более высокой чув-

ствительностью, специфичностью и прогностической значимостью, что делает её предпочтительной для долгосрочного скрининга нРНГ в районах с высокой заболеваемостью. Вопрос, окажется ли этот тест высокочувствительным для диагностики нРНГ в группе больных с метастазами опухоли из невыявленного первичного очага в эндемичном регионе, остаётся открытым [35].

### Заключение

Наше исследование одно из первых, проведённых в эндемичном регионе (Россия). Оно продемонстрировало, что серологические и молекулярные маркеры ВЭБ при их совместном использовании позволяют с достаточно высокой степенью вероятности осуществлять предварительную селекцию больных с подозрением на нРНГ среди онкологических больных, у которых первичный очаг опухоли неизвестен. Дальнейшие исследования с применением фиброоптической эндоскопии, гистологического анализа биоптата и, при необходимости, КТ или МРТ помогут установлению окончательного диагноза. Следует также отметить, что динамика копий вирусной ДНК в плазме больных нРНГ отражает эффект проведённой терапии и прогноз болезни: ремиссию, стабилизацию опухолевого процесса, рецидив или метастазирование. Титры вирус-специфических антител менее четко сопровождают клинические проявления болезни, но служат маркером для ранней и первичной диагностики нРНГ, в том числе у больных с метастатическими поражениями лимфатических узлов при невыявленной первичной локализации опухоли.

**Финансирование.** Исследование проведено под эгидой экспериментального правительственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации и координируется Центром стратегического планирования и управления рисками биомедицинского здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) (проект № 18-015-00505А).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-9, 11-28, 30, 32-35 см. REFERENCES)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность)*. М.; 2018.
- Белюсова Н.В., Поддубный Б.К., Унгиадзе Г.В., Кондрачева Т.Т., Архипов В.В., Пробагова Н.А. и др. Современная диагностика рака носоглотки. *Современная онкология*. 2000; 2(3): 78-82.
- Гурцевич В.Э., Степина В.Н., Сенюта Н.Б., Гончаров Е.В., Щербак Л.Н., Душенькина Т.Е. и др. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна-Барр в диагностике рака носоглотки (обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований). *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2011; 22(2): 20-30.

### REFERENCES

- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757-68. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
- Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J. Rare Dis*. 2006; 1: 23. Doi: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-23>

3. Marks J.E., Phillips J.L., Menck H.R. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1998; 83(3): 582-8. Doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142-\(19980801\)83:3<582::AID-CNCR29>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142-(19980801)83:3<582::AID-CNCR29>3.0.CO;2-R)
4. Pathmanathan R., Prasad U., Sadler R., Flynn K., Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333(11): 693-8. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM199509143331103>
5. Chien Y.C., Chen J.Y., Liu M.Y., Yang H.I., Hsu M.M., Chen C.J., et al. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(26): 1877-82. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011610>
6. Song C., Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pak. J. Med. Sci.* 2013; 29(3): 885-90. Doi: <https://doi.org/10.12669/pjms.293.2907>
7. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol. Pathol.* 2000; 53(5): 248-54. Doi: <https://doi.org/10.1136/mp.53.5.248>
8. Chang C.M., Yu K.J., Mbulaitete S.M., Hildesheim A., Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 2009; 143(2): 209-21. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
9. Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 2002; 12(6): 421-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/s1044579x02000858>
10. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *Malignant Neoplasms in Russia in 2017 (Morbidity and Mortality) [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost')]*. Moscow; 2018. (in Russian)
11. Hildesheim A., Apple R.J., Chen C.J., Wang S.S., Cheng Y.J., Klitz W., et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94(23): 1780-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/94.23.1780>
12. Jia W.H., Qin H.D. Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 117-26. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.009>
13. Chang E.T., Adami H.O. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15(10): 1765-77. Doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0353>
14. Shivappa N., Hebert J.R., Zucchetto A., Montella M., Libra M., Garavello W., et al. Increased Risk of Nasopharyngeal Carcinoma with Increasing Levels of Diet-Associated Inflammation in an Italian Case-Control Study. *Nutr. Cancer*. 2016; 68(7): 1123-30. Doi: <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1216137>
15. Xiong G., Zhang B., Huang M.Y., Zhou H., Chen L.Z., Feng Q.S., et al. Epstein-Barr virus (EBV) infection in Chinese children: a retrospective study of age-specific prevalence. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99857. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099857>
16. Wu L., Li C., Pan L. Nasopharyngeal carcinoma: A review of current updates. *Exp. Ther. Med.* 2018; 15(4): 3687-92. Doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5878>
17. Gallicchio L., Matanoski G., Tao X.G., Chen L., Lam T.K., Boyd K., et al. Adulthood consumption of preserved and nonpreserved vegetables and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *Int. J. Cancer*. 2006; 119(5): 1125-35. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.21946>
18. Tiwawech D., Srivatanakul P., Karalak A., Ishida T. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2005; 6(3): 270-5.
19. Guo X., O'Brien S.J., Zeng Y., Nelson G.W., Winkler C.A. GSTM1 and GSTT1 gene deletions and the risk for nasopharyngeal carcinoma in Han Chinese. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17(7): 1760-3. Doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0149>
20. Vaughan T.L., Stewart P.A., Teschke K., Lynch C.F., Swanson G.M., Lyon J.L., et al. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup. Environ. Med.* 2000; 57(6): 376-84. Doi: <https://doi.org/10.1136/oem.57.6.376>
21. Hildesheim A., Wang C.P. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000-2011: Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 107-16. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.007>
22. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375-81. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370308>
23. Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C. Factors affecting serum IgA antibody to Epstein-Barr viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 1978; 37(3): 356-62. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.1978.54>
24. Ho H.C., Kwan H.C., Ng M.H., de The G. Serum IgA antibodies to Epstein-Barr antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*. 1978; 1 (8061): 436. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)91220-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)91220-5)
25. Hou X., Zhao C., Guo Y., Han F., Lu L.X., Wu S.X., et al. Different Clinical Significance of Pre- and Post-treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load in Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Radiotherapy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. 2011; 23(2): 128-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clon.2010.09.001>
26. Wang W.Y., Twu C.W., Chen H.H., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J.Y., et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(3): 1016-24. Doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2796>
27. Fan H., Nicholls J., Chua D., Chan K.H., Sham J., Lee S., et al. Laboratory markers of tumor burden in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of viral load and serologic tests for Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer*. 2004; 112(6): 1036-41. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.20520>
28. Cao S.M., Liu Z., Jia W.H., Huang Q.H., Liu Q., Guo X., et al. Fluctuations of Epstein-Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up. *PLoS One*. 2011; 6(4): e19100. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019100>
29. Belousova N.V., Poddubnyy B.K., Ungiadze G.V., Kondrat'eva T.T., Arkhipov V.V., Probatova N.A., et al. Present-day diagnostics of nasopharyngeal carcinoma. *Sovremennaya onkologiya*. 2000; 2(3): 78-82. (in Russian)
30. Lawrence J.B., Villave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*. 1988; 52(1): 51-61. Doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90530-2)
31. Gurtsevich V.E., Stepina V.N., Senyuta N.B., Goncharov E.V., Shcherbak L.N., Dushen'kina T.E., et al. Humoral immune response to Epstein-Barr virus in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (literature review and 30 years of our own experience). *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN*. 2011; 22(2): 20-30. (in Russian)
32. Zhao F.P., Liu X., Chen X.M., Lu J., Yu B.L., Tian W.D., et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncol. Lett.* 2015; 10(5): 2888-94. Doi: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3628>
33. Leung S.F., Tam J.S., Chan A.T., Zee B., Chan L.Y., Huang D.P., et al. Improved accuracy of detection of nasopharyngeal carcinoma by combined application of circulating Epstein-Barr virus DNA and anti-epstein-Barr viral capsid antigen IgA antibody. *Clin. Chem.* 2004; 50(2): 339-45. Doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.022426>
34. Zhao F.P., Liu X., Zhong Z.M., Lu J., Yu B.L., Zeng F.Y., et al. Positivity of both plasma Epstein-Barr virus DNA and serum Epstein-Barr virus capsid specific immunoglobulin A is a better prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *BBA Clin.* 2014; 2: 88-93. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2014.10.003>
35. Yu X., Ji M., Cheng W., Wu B., Du Y., Cao S. Assessment of the Long-term Diagnostic Performance of a New Serological Screening Scheme in Large-scale Nasopharyngeal Carcinoma Screening. *J. Cancer*. 2018; 9(12): 2093-7. Doi: <https://doi.org/10.7150/jca.23755>

Поступила 13.06.19

Принята в печать 28.11.19

Иванова А.М.<sup>1</sup>, Имомалиева К.М.<sup>2</sup>, Наровлянский А.Н.<sup>1</sup>, Измestьева А.В.<sup>1</sup>,  
Сарымсаков А.А.<sup>3</sup>, Билалов Э.Н.<sup>2</sup>, Ершов Ф.И.<sup>1</sup>

## Глазные лекарственные плёнки в лечении экспериментального герпетического кератоконъюнктивита

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>«Ташкентская медицинская академия» Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, 100109, г. Ташкент, Узбекистан;

<sup>3</sup>«Институт химии и физики полимеров», Академия наук Республики Узбекистан, 100128, Ташкент, г. Узбекистан

**Введение.** Сложность терапии герпетического кератоконъюнктивита обусловлена тяжестью течения заболевания, осложнениями, переходом в хронические рецидивирующие формы и недостаточной эффективностью используемых лекарственных препаратов, что приводит к неуклонному увеличению количества больных.

**Цель** исследования – оценка терапевтической эффективности глазных лекарственных плёнок «ГлазАвир» в экспериментальной модели острой герпетической инфекции глаз у кроликов.

**Задачи** исследования: изучить специфическую активность «ГлазАвир» и сравнить отдалённые показатели проявления отдельных клинических признаков кератоконъюнктивита.

**Материал и методы.** В работе использовали кроликов породы «Шиншилла», вирус герпеса простого 1-го типа и глазные лекарственные плёнки «ГлазАвир». Модель офтальмологической герпетической инфекции формировали путём заражения кроликов вирусосодержащим материалом предварительно скарифицированной роговицы глаза на фоне местной анестезии. Лечили животных препаратом «ГлазАвир» – 1 аппликация в день в течение 7 дней. Наблюдали животных ежедневно в течение 15 дней, затем каждые 3 дня до 25-го дня наблюдения. Эффективность препарата оценивали на пике развития патологического процесса.

**Результаты и обсуждение.** Наблюдали снижение смертности опытных животных с 50 до 20% и увеличение средней продолжительности жизни на 27,87% по сравнению с контролем у животных, леченных препаратом «ГлазАвир». У кроликов, получавших лечение глазными лекарственными плёнками «ГлазАвир», после активизации герпетического кератоконъюнктивита на 2–5-й день, на пике развития заболевания (6–9-й день) отмечено статистически достоверное снижение активности патологического процесса ( $p < 0,05$ ). Тенденция к нормализации состояния у леченных препаратом «ГлазАвир» кроликов прослеживалась до 14-го дня наблюдения.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о выраженной эффективности препарата «ГлазАвир» при лечении экспериментального герпесвирусного кератоконъюнктивита.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса; офтальмогерпес; герпетический кератоконъюнктивит; глазные лекарственные плёнки.

**Для цитирования:** Иванова А.М., Имомалиева К.М., Наровлянский А.Н., Измestьева А.В., Сарымсаков А.А., Билалов Э.Н., Ершов Ф.И. Глазные лекарственные плёнки в лечении экспериментального герпетического кератоконъюнктивита. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(5): 238-245. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-238-245>

### Информация об авторах:

Иванова А.М., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Имомалиева К.М., <http://orcid.org/0000-0003-3869-9411>

Наровлянский А.Н., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Измestьева А.В., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Сарымсаков А.А., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Билалов Э.Н., <http://orcid.org/0000-0002-3484-1225>

Ершов Ф.И., <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

**Для корреспонденции:** Наровлянский Александр Наумович, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитокинов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва; <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>. E-mail: [narovl@yandex.ru](mailto:narovl@yandex.ru)

Ivanova A.M.<sup>1</sup>, Imomalieva K.M.<sup>2</sup>, Narovlyansky A.N.<sup>1</sup>, Izmes't'eva A.V.<sup>1</sup>, Sarymsakov A.A.<sup>3</sup>, Bilalov E.N.<sup>2</sup>, Ershov F.I.<sup>1</sup>

## Ophthalmic drug films in the therapy of experimental herpetic keratoconjunctivitis

<sup>1</sup>National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>2</sup>Tashkent Medical Academy, Tashkent, 100109, Uzbekistan;

<sup>3</sup>Institute of Polymer Chemistry and Physics, Tashkent, 100128, Uzbekistan

**Introduction.** The complexity of the treatment of herpetic keratoconjunctivitis is due to the severity of the disease, complications, the transition to chronic relapsing forms and the insufficient effectiveness of the drugs used, which leads to a steady increase in the number of patients.

**The aim** of the study was to evaluate the therapeutic efficacy of the eye drug films «GlazAvir» in the experimental model of acute herpetic eye infection in rabbits.

**Research objectives:** to study the specific activity of «GlazAvir» and compare the long-term indicators of the level of manifestation of individual clinical signs of keratoconjunctivitis.

**Material and methods.** In the work we used rabbits of the Chinchilla breed, the herpes simplex virus type 1 and the eye drug films «GlazAvir». A model of ophthalmic herpetic infection was formed by infection of rabbits with virus-containing material of a pre-scarified eye cornea against the background of local anesthesia. Animals were treated with the drug «GlazAvir» - 1 application per day for 7 days. Animals were observed daily for 15 days, then every 3 days until the 25th day of observation. The effectiveness of the drug was evaluated at the peak of the development of the pathological process.

**Results and discussion.** There was a decrease in mortality from 50 to 20%, and an increase in average life expectancy by 27.87%, compared with the control in animals treated with «GlazAvir». It was noted after activation of herpetic keratoconjunctivitis on the 2nd – 5th day, at the peak of the disease (6–9th day) a statistically significant decrease in the activity of the pathological process ( $p < 0.05$ ) by rabbits treated with the «GlazAvir» ophthalmic drug films. The tendency to normalization by the rabbits treated with the «GlazAvir» preparation was observed until the 14th day.

**Conclusion.** The data obtained indicate the pronounced effectiveness of the «GlazAvir» preparation in the treatment of experimental herpesvirus keratoconjunctivitis.

**Keywords:** *herpes simplex virus; ophthalmic herpes; herpesvirus keratoconjunctivitis; ophthalmic drug films.*

**For citation:** Ivanova A.M., Imomaliyeva K.M., Narovlyansky A.N., Izmest'eva A.V., Sarymsakov A.A., Bilalov E.N., Ershov F.I. Ophthalmic drug films in the therapy of experimental herpetic keratoconjunctivitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 238-245. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-238-245>

**For correspondence:** Alexander N. Narovlyansky, DBS, Chief Researcher of the Cytokine Laboratory, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: [narovl@yandex.ru](mailto:narovl@yandex.ru)

**Information about author:**

Ivanova A.M., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Imomaliyeva K.M., <http://orcid.org/0000-0003-3869-9411>

Narovlyansky A.N., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Izmest'eva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Sarymsakov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Bilalov E.N., <http://orcid.org/0000-0002-3484-1225>

Ershov F.I. <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 08 November 2018

Accepted 28 November 2018

## Введение

Воспалительные заболевания глаз составляют около 62% всех офтальмологических заболеваний. Примерно 80% случаев временной нетрудоспособности и 10–30% случаев, оканчивающихся слепотой, связаны именно с воспалительными заболеваниями глаз. Особое место среди инфекционно-воспалительных заболеваний глаз занимают кератиты и конъюнктивиты вирусной этиологии [1, 2].

Так, при офтальмогерпесе доминирующей формой является герпетический кератоконъюнктивит (ГКК), что связывают с высоким уровнем (около 90%, по данным ВОЗ) инфицирования населения одним или несколькими типами вирусов герпеса. ГКК у взрослых составляет в среднем 25–55% всех воспалительных заболеваний роговицы [3–5].

Основными биологическими и патогенетическими особенностями вирусов герпеса являются их политропность, способность к длительной персистенции и реактивации [6]. Данные свойства обуславливают полиорганность поражения при генерализованных формах герпетической инфекции, полиморфизм клинических симптомов и высокую вероятность перехода инфекции в хроническую рецидивирующую форму [7–9]. В случае офтальмогерпеса возможно поражение всех структур глаза, начиная от век и заканчивая зрительным нервом [10–14], однако наиболее часто местом локализации вируса является роговица [15, 16].

Сложность терапии ГКК обусловлена тяжестью течения заболевания, осложнениями, переходом в хронические рецидивирующие формы [17] и недостаточной эффективностью используемых лекарственных препаратов, что приводит к наблюдаемому в последние годы неуклонному росту количества больных. Поэтому назрела острая необходимость не только в поиске и разработке новых препаратов, но и в создании более совершенных готовых лекарственных форм на основе известных лекарственных средств, в разработке новых путей их доставки, регулировании скорости действия и времени их контакта с организмом. Такие лекарственные препараты отнесены к новой группе – «препараты направленного и пролонгированного действия» [18, 19].

В современной медицине всё большее распространение получают глазные лекарственные плёнки (ГЛП), которые используют с целью замены частых инстилляций глазных капель и пролонгирования действия лекарственных веществ за счёт удлинения времени контакта плёнки с поверхностью ткани конъюнктивального мешка, что позволяет снизить дозы лекарственного вещества и уменьшить побочные эффекты [20–23].

В Институте химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан разработаны противовирусные ГЛП «ГлазАвир», созданные с использованием субстанции «ЦелАгрип», разрешённой к производству и применению в медицинской практике в Респуб-

ке Узбекистан [24]. При изучении безопасности ГЛП «ГлазАвир» в экспериментах на кроликах не выявлено негативного воздействия плёнок на функциональное состояние глаза и общее состояние животного, а также признаков непереносимости препарата со стороны гистоморфологических структур [25].

В настоящем исследовании терапевтическую эффективность ГЛП «ГлазАвир» изучали на экспериментальной модели ГКК у кроликов [26]. Работу выполняли в соответствии с требованиями нормативных документов, определяющих формат доклинических исследований лекарственных средств<sup>1</sup>.

**Цель** исследования – оценка терапевтической эффективности ГЛП «ГлазАвир» в экспериментальной модели острой герпетической инфекции глаз у кроликов.

**Задачи** исследования:

- изучить специфическую активность ГЛП «ГлазАвир» при применении 1 раз в сутки в течение 7 дней при острой форме экспериментальной герпетической инфекции глаз у кроликов;
- сравнить отдалённые показатели клинических признаков ГКК у кроликов экспериментальных групп, инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1).

### Материал и методы

**Животные.** Взрослые особи самцов кроликов «Шиншилла» массой тела 2,5–3 кг, полученные из ФГУП ОПХ «Манихино» (Московская обл., Истринский р-н, с/п Ивановское). Масса тела отобранных для исследования животных отличалась от средней массы тела кроликов не более чем на 20% ( $\pm 10\%$ ). Содержание и использование лабораторных животных осуществляли в соответствии с нормативными документами<sup>2</sup> и требованиями Комитета по биомедицинской этике ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Количество животных, используемых в исследовании, достаточно для полной статистически значимой регистрации изучаемых эффектов и является минимально рациональным с точки зрения этических принципов.

**Вирус.** Для формирования экспериментальной герпетической инфекции у кроликов использовали ВПГ-1 штамм VR-3. Вирус размножили и титровали *in vitro* на перевиваемой культуре клеток почек зелёных мартышек (Vero). При заражении кроликов использовали вирус с инфекционным титром 4 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл [27].

**Препараты.** Исследуемый препарат «ГлазАвир» представляет собой противовирусные ГЛП, содержащие 20% активного вещества «ЦелАгрип». Субстанция «ЦелАгрип» (Celagripum, НПП «Radiks», Республика Узбекистан) является сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и госсипола, обладающим интерферониндуцирующей активностью. ГЛП

проходят медико-биологические (доклинические) исследования в качестве лекарственной формы с пролонгированным эффектом для лечения заболеваний глаз вирусной этиологии. Параметры плёнок: длина 0,6–0,9 см, ширина 0,3–0,45 см, толщина 0,004–0,008 см, масса 0,007–0,015 г. После упаковки по 10 или 25 штук в двухслойные полиэтиленовые пакетики ГЛП стерилизуют гамма-облучением (2,5 Мрад).

В качестве препарата сравнения были использованы глазные капли «Актипол 0,007%» (аминобензойная кислота 0,007%, ЗАО «Институт молекулярной диагностики «Диафарм», Россия; рег. № 002176/01-2003 от 18.04.2008).

В ходе эксперимента при проведении специфической противовирусной терапии дополнительно, с целью профилактики бактериального заражения, использовали антибактериальные глазные капли «Ципролет», содержащие эквивалент 3 мг/мл ципрофлоксацина (Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия).

**Формирование модели офтальмологической герпетической инфекции у кроликов.** Заражение животных проводили на фоне местной анестезии (новокаин 5%) слизистой оболочки глаза. Вирусосодержащий материал в объеме 0,02 мл наносили на предварительно скарифицированную роговицу левого глаза кролика и лёгкими массирующими движениями в течение 2–3 мин втирали через веко в поверхность слизистой, правый глаз оставался интактным. В последующем животных ежедневно осматривали, фиксировали изменения общего состояния и проявления признаков формирования патологического процесса на левом глазу. Клиническая оценка патологического процесса у кроликов основывалась на визуальном осмотре и офтальмологическом обследовании в боковом (фокальном) освещении слизистой глаз.

**Формирование экспериментальных и контрольных групп** осуществляли подбором животных с равнозначными клиническими проявлениями. Были сформированы следующие группы животных: контрольная (без специфической терапии), сравнения (лечение препаратом «Актипол 0,007%») и основная (лечение ГЛП «ГлазАвир»). Количество животных в группах составляло 4, 5 и 5 соответственно.

**Лечение экспериментальных животных** противовирусными препаратами начинали на 2–3-й день после заражения (время манифестации заболевания). Лекарственные препараты вводили согласно схеме: аппликация ГЛП «ГлазАвир» 1 раз в день, глазные капли «Актипол 0,007%» по 1 капле 4 раза в день, «Ципролет» по 1 капле 2 раза в день. Продолжительность лечения составила 7 дней. Учитывая, что в офтальмологической практике в случае поражения ГКК одного глаза лечение проводят на оба глаза, в эксперименте лекарственные препараты вводили в оба глаза кролика. Визуальное и офтальмологическое наблюдение за

<sup>1</sup>Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012.

<sup>2</sup>Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; 1996; ГОСТ Р 53434-2009; ГОСТ 33216-2014; ГОСТ 33215-2014; ГОСТ 51232-98; Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.

животными проводили ежедневно в течение 15 дней и каждые 3 дня до 25-го дня наблюдения.

Среднюю продолжительность жизни животных (СПЖ) рассчитывали за период наблюдения 25 дней с учётом времени жизни (дни) погибших и выживших животных в соответствии с формулой:

$$1/T = (1/t_1 + 1/t_2 + \dots + 1/t_n) : N, \quad (1)$$

где T – средняя продолжительность жизни;  $t_1, t_2, \dots, t_n$  – продолжительность жизни каждого животного в группе из N животных.

Индекс защиты (IP) в % рассчитывали по формуле:

$$IP = ((M_c - M_e) / M_c) \cdot 100\%, \quad (2)$$

где  $M_c$  и  $M_e$  – смертность (в %) в контрольной и опытной группах соответственно.

Увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле:

$$U = (L_o / L_k - 1) 100\%, \quad (3)$$

где U – увеличение продолжительности жизни (в %),  $L_o$  – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе,  $L_k$  – средняя продолжительность жизни в контрольной группе [28].

Эффективность препарата оценивали на пике развития патологического процесса по снижению выраженности клинических проявлений и сокращению сроков заболевания. Инфекционный процесс у кроликов фиксировали по активности проявления специфических признаков ГКК. Определяли следующие патологические изменения:

– конъюнктивы: а) гиперемия, б) инъекция сосудов, в) отёк конъюнктивы, г) гипертрофия фолликул конъюнктивы нижнего и верхнего века;

– роговица: а) отёчность, б) прозрачность, в) шероховатость поверхности, г) чувствительность, е) васку-

ляризация, ж) наличие инфильтрации, з) роговичный синдром;

– отделяемое из глаз: а) серозное, б) смешанное, в) гнойное, г) фибринозная плёнка.

Максимальную выраженность каждого признака оценивали в 3 балла. На основании учёта патологических изменений в баллах определяли суммарный индекс выраженности (суммарной активности клинических симптомов ГКК) симптоматики (СИВС) у кроликов, получавших испытуемый препарат и препараты сравнения с целью лечения и/или в качестве контроля. Результаты исследования анализировали с использованием методики для малых выборок. Частичный расчёт статистических характеристик проводили с помощью программы Microsoft Excel. Различия в группах вычисляли по *t*-критерию Стьюдента и считали значимыми при  $p < 0,05$  [28–30].

### Результаты

За период эксперимента у отдельных животных, заражённых ВПГ-1, наблюдали генерализацию герпетической инфекции, что привело к их гибели. В табл. 1 представлены данные о количестве и сроках гибели животных, а также показатели СПЖ [28].

Как видно из данных табл. 1, в опытных группах погибло в 2 раза меньше животных, чем в контрольной (без специфической терапии). При этом наблюдалось снижение смертности с 50 до 20%, индекс защиты при специфической терапии составил 60%, увеличение продолжительности жизни в группах, леченных «Актиполом 0,007%» и ГЛП «ГлазАвир», по сравнению с контрольной группой составило 11,5 и 27,87% соответственно.

Таблица 1

Количество, сроки гибели и средняя продолжительность жизни (СПЖ) кроликов

Группа животных	Количество животных в группе, n	Количество погибших животных	Дни жизни животных до гибели	СПЖ, дни	Смертность, %	Индекс защиты, %	Увеличение СПЖ, дни	Увеличение продолжительности жизни, в %
1-я (контрольная группа, без специфической терапии)	4	2	11 14	16,5	50	–	–	–
2-я (группа сравнения, «Актипол 0,007%»)	5	1	9	18,4	20	60	1,9	11,5
3-я (основная группа, ГЛП «ГлазАвир»)	5	1	13	21,1	20	60	4,5	27,87

Таблица 2

Средний показатель суммарного индекса выраженности симптомов (СИВС) по группам у всех кроликов, взятых в эксперимент, и кроликов, выживших за первые 9 дней наблюдения

Группа животных	Сумма средних значений СИВС, баллы ( $M \pm m$ )		p
	расчёт с учётом погибших и выживших кроликов	расчёт с учётом только выживших кроликов	
1-я (контрольная группа, без специфической терапии)	149,2 ± 8,58 при n = 4	151,3 ± 11,25 при n = 2	0,89303
2-я (группа сравнения, «Актипол 0,007%»)	146,0 ± 14,92 при n = 5	154,5 ± 15,82 при n = 4	0,70799
3-я (основная группа, ГЛП «ГлазАвир»)	128,1 ± 14,55 при n = 5	121,38 ± 16,66 при n = 4	0,77063

Примечание. M – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка средней арифметической.

Таблица 3

Активность проявления кератоконъюнктивита у кроликов

Дни после заражения ВПГ-1	Сумма средних значений суммарного индекса выраженности симптомов, баллы ( $M \pm m$ )				
	1-я группа* ( $n = 4$ )	2-я группа** ( $n = 5$ )	$p$	3-я группа*** ( $n = 5$ )	$p$
7–9-й	85,1 ± 3,83	67,2 ± 8,62	0,11107	54,2 ± 9,28	0,02555****
2–9-й	149,1 ± 8,58	146,0 ± 14,92	0,86171	128,1 ± 14,55	0,25789

Примечание. ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1-го типа; \* контрольная группа без специфической терапии; \*\* группа сравнения, получавшая препарат «Актипол 0,007%»; \*\*\*основная группа, леченная ГЛП «ГлазАвир»; \*\*\*\*  $p < 0,05$ ;  $M$  – средняя арифметическая;  $m$  – стандартная ошибка средней арифметической.

Таблица 4

Активность проявления отдельных клинических признаков кератоконъюнктивита у кроликов с 19-го по 25-й день наблюдения

Клинические признаки конъюнктивита	1-я группа* ( $n = 3$ )		2-я группа** ( $n = 4$ )		3-я группа*** ( $n = 4$ )		$p$
	$M$	$m$	$M$	$m$	$M$	$m$	
Гиперемия конъюнктивы	0,00	0,00	0,80	0,58	0,90	0,24	0,07
Конъюнктивальная инъекция (а)	0,20	0,09	0,80	0,37	1,55	0,50	0,13
Перикорниальная инъекция (б)	0,00	0,00	0,10	0,10	0,20	0,20	0,58
Смешанная инъекция (а + б)	0,00	0,00	0,40	0,40	0,30	0,20	0,36
Гипертрофия фолликул нижнего и верхнего века	0,00	0,00	0,15	0,15	0,00	0,00	0,37
Помутнение (следы мути) роговицы	0,60	0,29	1,15	0,36	1,10	0,34	0,43
Васкуляризация	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,37
Точечная инфильтрация (по лимбу)	0,20	0,12	0,50	0,32	1,20	0,34	0,12
Слезотечение	0,40	0,29	0,10	0,10	0,15	0,10	0,72
Светобоязнь	0,20	0,20	0,40	0,24	3,20	0,92	<b>0,04<sup>^</sup></b>
Смешанное отделяемое (серозное + гнойное)	0,00	0,00	0,10	0,10	0,05	0,05	0,58
Плёнка фибринозная	0,00	0,00	0,40	0,40	0,00	0,00	0,37
Средняя суммарная активность	1,60	0,79	5,00	1,95	8,50	2,20	0,12

Примечание. \* контрольная группа без специфической терапии; \*\* группа сравнения, получавшая препарат «Актипол 0,007%»; \*\*\* основная группа, леченная ГЛП «ГлазАвир»; <sup>^</sup>  $p < 0,05$ ;  $M$  – средняя арифметическая,  $m$  – стандартная ошибка средней арифметической.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в средних показателях СИВС по группам у всех кроликов, взятых в эксперимент, и кроликов, оставшихся в живых за первые 9 дней наблюдения (до дня гибели первого кролика в эксперименте). Поэтому в последующих расчетах средних показателей учитывали данные наблюдения всех экспериментальных животных.

Стоит отметить, что активность инфекционного процесса во всех трёх экспериментальных группах менялась, но изменения были незначительные и статистически недостоверные. При этом показатели активности патологического процесса у животных 3-й группы, леченных ГЛП «ГлазАвир», были ниже, чем в других группах (128,1 ± 14,55, 121,38 ± 16,66 балла).

Динамика ГКК по дням представлена на рис. 1. При формировании патологического процесса у кроликов, получавших лечение ГЛП «ГлазАвир», после постепенной активизации болезни (на 2, 3, 4 и 5-й дни после заражения) на пике развития заболевания (6, 7, 8 и 9-й дни) наблюдали стойкое статистически достоверное снижение активности процесса (табл. 3, рис. 2).

Тенденция к нормализации состояния у леченных ГЛП «ГлазАвир» кроликов прослеживалась и в дальнейшем, до 14-го дня наблюдения.

При анализе изменения динамики среднего по-

казателя активности проявления ГКК у кроликов по группам обращает на себя внимание факт, что после 15-го дня наблюдения, когда активность инфекционного процесса у животных в контрольной (нелеченой) группе имеет стойкую тенденцию к снижению, у кроликов, которых лечили исследуемым препаратом (ГЛП «ГлазАвир») и препаратом сравнения («Актипол») она остаётся несколько выше контрольных показателей. Кроме того, к 22-му дню с момента заражения отмечали умеренную активизацию процесса у животных этих групп ( $p = 0,04$ ) (табл. 4).

По данным табл. 4, показатели СИВС свидетельствуют о том, что активность инфекционного процесса у животных, для лечения которых использовали ГЛП, на этапе выздоровления (19–25-й дни) в 5,3 и 1,7 раза превышает показатели контрольной группы и группы сравнения соответственно. Основные признаки болезни, формирующие относительно высокий уровень показателя активности процесса, связаны с повторным развитием светобоязни у всех животных, которых лечили ГЛП.

**Обсуждение**

Полученные данные свидетельствуют о том, что активизация процесса у кроликов, леченных «Актипол» (группа сравнения), началась уже на 4-й день

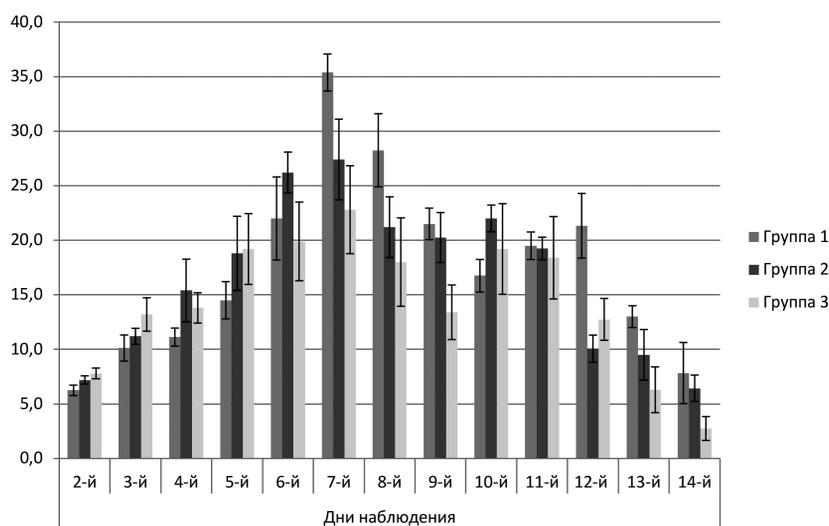


Рис. 1. Активность проявления кератоконъюнктивита у кроликов в экспериментальных (инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа) группах.

1-я группа – контрольная, без специфической терапии; 2-я – группа сравнения, получавшая лечение препаратом «Актипол 0,007%»; 3-я – основная группа, получавшая лечение глазными лекарственными плёнками «ГлазАвир». По оси абсцисс – дни наблюдения после заражения вирусом простого герпеса 1-го типа; по оси ординат – активность проявления кератоконъюнктивита у кроликов (суммарный индекс выраженности симптомов, баллы).



Рис. 2. Проявления кератоконъюнктивита у кроликов контрольной группы, без специфической терапии (а), и основной группы, получавших лечение глазной лекарственной плёнкой «ГлазАвир» (б), на пике патологического процесса (9-й день после экспериментального заражения вирусом герпеса простого 1-го типа штаммом VR-3).

после заражения, и активность проявления болезни была выше, чем в двух других экспериментальных группах (на 38,7 и 11,6% по сравнению с кроликами контрольной группы и леченных ГЛП «ГлазАвир» соответственно). Тенденция к активизации ГКК и манифестации болезни проявилась на 6-й день наблюдения и была выше, чем в двух других группах (на 15%). Только на пике развития болезни (7-й и 8-й дни наблюдения) отмечено подавление инфекционного процесса у леченных «Актиполом» кроликов.

Принципиально иной была динамика формирования патологического процесса у кроликов, получавших лечение ГЛП «ГлазАвир». После постепенной активизации болезни (на 2, 3, 4 и 5-й дни наблюдения) на пике развития заболевания (6, 7, 8 и 9-й дни) у них отмечено стойкое снижение активности процесса (на 30,8%) с тенденцией к нормализации состояния вплоть до 14-го дня наблюдения.

Как указывалось выше, после 15-го дня наблюдения, когда активность инфекционного процесса у животных в контрольной (нелеченой) группе имела стойкую тенденцию к снижению, у кроликов, которых лечили исследуемым препаратом (ГЛП «ГлазАвир») и препаратом сравнения («Актипол»), активность инфекционного процесса была несколько выше показателей контрольной группы.

Сравнительный анализ уровня активности специфических клинических симптомов ГКК у кроликов, инфицированных ВПГ-1, показывает, что при экспериментальной офтальмологической герпетической инфекции основными симптомами поражения слизистой глаза животных являются гиперемия конъюнктивы, различного вида инъекции (конъюнктивальная, перикорнеальная, смешанная), а также отёк конъюнктивы. Признаки поражения роговицы преимущественно выражены её отёком, помутнени-

ем и шероховатостью. При вирусном конъюнктивите у кроликов ярко проявляется роговичный синдром, который характеризуется слезотечением, светобоязнью и болезненностью. Анализ уровня активности отдельных клинических признаков ГКК у кроликов по группам свидетельствует об увеличении интенсивности проявления ряда диагностических показателей у животных из группы, которую лечили препаратом «Актипол», как следствие увеличивались суммарные показатели проявления болезни, отмеченные ранее. У животных этой группы основные клинические симптомы болезни были более выраженными по сравнению как с контрольной группой, так и с группой, которую лечили исследуемым препаратом «ГлазАвир». Так, у них значительно интенсивнее (в 1,8 раза) по сравнению с контролем проявлялись признаки смешанной инъекции, и в 2,4 раза чаще формировалась гипертрофия фолликул нижнего и верхнего века. При этом следует отметить, что у животных основной группы (на фоне лечения ГЛП «ГлазАвир») также проявлялось незначительное по сравнению с контролем увеличение частоты этих признаков, но в целом у кроликов, которых лечили новым препаратом в виде ГЛП, симптоматика ГКК была менее выражена. Как правило, уровень проявления отдельных симптомов болезни оставался в пределах показателей в контрольной группе (гиперемия и отёк конъюнктивы, гипертрофия фолликул нижнего и верхнего века, болезненность, серозное отделяемое) либо был несколько ниже (конъюнктивальная инъекция, отёк, помутнение и шероховатость роговицы, слезотечение). Тем не менее в случае лечения ГКК у кроликов с использованием ГЛП отмечено повышение частоты проявления по сравнению с показателями в контрольной группе симптоматических признаков болезни: эрозии роговицы – в 1,7 раза, точечной инфильтрации по лимбу – в 1,3 раза, светобоязни – в 1,2 раза. Подобное явление, по всей видимости, обусловлено местной реакцией роговицы на аппликацию ГЛП, содержащих индуктор интерферона. Этого можно избежать, разработав более рациональную схему лечения.

Таким образом, проведённое исследование показало, что при развитии генерализованной герпетической инфекции, несмотря на одинаковое число погибших животных в основной группе и в группе сравнения, СПЖ кроликов, получавших лечение экспериментальным препаратом ГЛП «ГлазАвир», была значительно выше. Средняя суммарная активность патологического процесса в течение 9 дней наблюдения свидетельствовала о том, что его интенсивность у животных основной группы была ниже аналогичных показателей сравнительной и контрольной групп. Анализ динамики течения патологического процесса по дням показал, что под действием экспериментального препарата «ГлазАвир», как и в случае с «Актиполом» в течение первых 5 дней происходит его активация. Максимальная терапевтическая активность препарата проявлялась на пике заболевания (6–9-й дни), когда показатели СИВС были значительно ниже таковых в группах сравнения и контрольной. Прояв-

ление основных симптомов манифестации болезни животных, леченных ГЛП, также были ниже показателей в группах сравнения и контрольной.

### Выводы

1. Средняя продолжительность жизни кроликов, получавших лечение новым лекарственным препаратом ГЛП «ГлазАвир», превышает таковую у кроликов контрольной группы на 27,87% (4,5 дня).

2. У кроликов, леченных ГЛП «ГлазАвир», на пике развития заболевания (6, 7, 8 и 9-й день) наблюдали стойкое снижение активности патологического процесса (на 30,8%), что свидетельствует об эффективности ГЛП при лечении экспериментального герпесвирусного кератоконъюнктивита.

3. Сравнение отдалённых показателей уровня проявления отдельных клинических признаков (СИВС) ГКК у кроликов экспериментальных групп (инфицированных ВПГ-1) выявило, что активность патологического процесса у животных, для лечения которых использовали ГЛП «ГлазАвир», на этапе выздоровления (19–25-й дни) превышает показатели контрольной группы и группы сравнения. Основные признаки болезни, формирующие относительно высокий уровень активности процесса, связаны с достоверным развитием светобоязни ( $p < 0,05$ ) у всех животных, которых лечили ГЛП. Подобное явление, по всей видимости, обусловлено местной реакцией роговицы на аппликацию ГЛП, содержащих индуктор интерферона, что можно избежать, разработав более рациональную схему лечения.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-6, 8-14, 16, 17, 30 см. REFERENCES)

1. Бикбов М.М., Мальханов В.Б., Бабушкин А.Э. *Конъюнктивиты: дифференциальная диагностика и лечение*. М.; 2015.
2. Майчук Ю.Ф. Офтальмоферон в лечении аллергических, инфекционно-аллергических, токсико-аллергических конъюнктивитов и болезни сухого глаза. *Российский офтальмологический журнал*. 2011; 4(3): 78-84.
3. Сдобникова С.В., Троицкая Н.А., Сурнина З.В., Патенюк Л.С. Общие и офтальмологические проявления герпесвирусных инфекций. *Офтальмология*. 2016; 13(4): 228-34. Doi: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2016-4-228-234>
7. Зайнутдинова Г.Х. Современные подходы к лечению и профилактике рецидивов офтальмогерпеса. Обзор. *Офтальмология*. 2019; 16(1S): 12-20. Doi: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1S-12-20>
15. Вахова Е.С. Герпетический блефарокератоконъюнктивит. Клинические случаи. *Российская педиатрическая офтальмология*. 2018; 13(4): 185-8. Doi: <https://doi.org/10.18821/1993-1859-2018-13-4-185-188>
18. Арова А.А., Петров А.В. Современный арсенал антигерпетических лекарственных средств. *Лекарственный вестник*. 2006; 5: 15-9.
19. Майчук Ю.Ф., Поздняков В.И., Хромов Г.Л. Глазные лекарственные пленки. *Вестник офтальмологии*. 1974; (6): 73-6.
20. Батырбеков Е.О., Утельбаева З.Т., Умерзакова М.Б., Исмаилова А.Б., Бейшанова М.Ф., Ботабекова Т.К. Релиз лекарственных препаратов из полимерных глазных пленок. *Фундаментальные исследования*. 2011; (7): 233-4.
21. Гайсина Г.Я., Азаматова Г.А., Азнабаев М.Т. Глазная лекарственная пленка как оптимальная лекарственная форма для

- предоперационной профилактики инфекционных осложнений в офтальмохирургии. В кн.: *Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы офтальмологии»*. Оренбург; 2013: 8-16.
22. Азнабаев М.Т., Гайсина Г.Я., Азаматова Г.А., Габидуллин Ю.З. Оценка эффективности методов предоперационной антибиотикопрофилактики в полостной офтальмохирургии. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2015; 10(2): 85-8.
  23. Гайсина Г.Я., Азнабаев М.Т., Азаматова Г.А., Габидуллин Ю.З. Изучение терапевтического эффекта глазных лекарственных пленок с моксифлоксацином на модели экзогенного бактериального воспаления глаз. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2015; 10(2): 126-9.
  24. Сарымсаков А.А., Ли Ю.Б., Рашидова С.Ш. Глазные лекарственные пленки для лечения вирусных заболеваний глаза. В кн.: *Сборник статей VII Международной научной конференции «Приоритетные направления в области науки и технологии в XXI веке». Том 1*. Ташкент; 2014: 105-9.
  25. Билалов Э.Н., Бахритдинова Ф.А., Имомалиева К.М. Оценка переносимости глазной лекарственной пленки «глазавир» в эксперименте. В кн.: *Российский общенациональный офтальмологический форум. Том 2*. М.: Апрель; 2018: 442-6.
  26. Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Голубев С.Ю., Вишнев С.Г. *Герпетическая инфекция: вопросы патогенеза, методические подходы к терапии*. М.; 1997.
  27. Иванова А.М., Наровлянский А.Н., Шевлягина Н.В., Боровая Т.Г., Измest'eva A.B., Герасимова Е.В. и др. Эффективность препаратов Фортепреп и Ацикловир в экспериментальной модели инфекции простого герпеса 2-го типа (генитальный герпес, ВПГ-2) у морских свинок. В кн.: *Сборник научных статей «Интерферон-2011»*. М.; 2012: 424-30.
  28. Пшеничников В.А., Семенов Б.Ф., Зезеров Е.Г. *Стандартизация методов вирусологических исследований*. М.: Медицина; 1974.
  29. Ашмарин И.П., Вороб'ев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Медгиз; 1962.
- ### REFERENCES
1. Bikbov M.M., Mal'khanov V.B., Babushkin A.E. *Conjunctivitis: Differential Diagnosis and Treatment [Kon'yunktivity: differentsial'naya diagnostika i lechenie]*. Moscow; 2015. (in Russian)
  2. Maychuk Yu.F. Ophthalmoforein in the treatment of allergic, inflammatory-allergic, toxicoallergic conjunctivitis and dry eye syndrome. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2011; 4(3): 78-84. (in Russian)
  3. Sdobnikova S.V., Troitskaya N.A., Surnina Z.V., Pateyuk L.S. General and ophthalmological manifestations of herpesvirus infections. *Oftal'mologiya*. 2016; 13(4): 228-34. Doi: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2016-4-228-234> (in Russian)
  4. Yanoff M., Duker S. *Ophthalmology*. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2009.
  5. Looker K., Garnett G. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex. Transm. Infect.* 2005; 81(2): 103-7. Doi: <https://doi.org/10.1136/sti.2004.012039>
  6. Kennedy P.G.E., Rovnak J., Badani H., Cohrs R.J. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 7): 1581-602. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000128>
  7. Zaynutdinova G.Kh. Modern approaches to the treatment and prevention of recurrence of ophthalmic herpes. *Oftal'mologiya*. 2019; 16(1S): 12-20. Doi: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1S-12-20> (in Russian)
  8. Farooq A.V., Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv. Ophthalmol.* 2012; 57(5): 448-62. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2012.01.005>
  9. Kinchington P.R., Leger A.J., Guedon J.M., Hendricks R.L. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. *Herpesviridae*. 2012; 3(1): 5. Doi: <https://doi.org/10.1186/2042-4280-3-5>
  10. Liesegang T.J. Herpes zoster ophthalmicus natural history, risk factors, clinical presentation, and morbidity. *Ophthalmology*. 2008; 115(2 Suppl.): S3-12. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.10.009>
  11. Pleyer U., Chee S.P. Current aspects on the management of viral uveitis in immunocompetent individuals. *Clin. Ophthalmol.* 2015; 9: 1017-28. Doi: <https://doi.org/10.2147/OPTH.S60394>
  12. Wickremasinghe S.S., Stawell R., Lim L., Pakrou N., Zamir E. Non-necrotizing herpetic vasculitis. *Ophthalmology*. 2009; 116(2): 361. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.09.043>
  13. Cochrane T.F., Silvestri G., McDowell C., Foot B., McAvoy C.E. Acute retinal necrosis in the United Kingdom: results of a prospective surveillance study. *Eye (Lond)*. 2012; 26(3): 370-8. Doi: <https://doi.org/10.1038/eye.2011.338>
  14. Sancho-Shimizu V., Zhang S.Y., Abel L., Tardieu M., Rozenberg F., Jouanguy E., et al. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 7(6): 495-505. Doi: <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3282f151d2>
  15. Vakhova E.S. Herpetic blefaroceroconjunctivitis. Clinical cases. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya*. 2018; 13(4): 185-8. Doi: <https://doi.org/10.18821/1993-1859-2018-13-4-185-188> (in Russian)
  16. Wensing B, Relvas L.M., Caspers L.E., Valentincic N.V., Stunf S., de Groot-Mijnes J.D., et al. Comparison of rubella virus- and herpes virus-associated anterior uveitis: clinical manifestations and visual prognosis. *Ophthalmology*. 2011; 118(10): 1905-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.03.033>
  17. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 1: CD002898. Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub5>
  18. Arova A.A., Petrov A.V. Modern Arsenal of antiherpetic drugs. *Lekarstvennyy vestnik*. 2006; 5: 15-9. (in Russian)
  19. Maychuk Yu.F., Pozdnyakov V.I., Khromov G.L. Eye drug films. *Vestnik oftal'mologii*. 1974; (6): 73-6. (in Russian)
  20. Batyrbekov E.O., Utel'baeva Z.T., Umerzakova M.B., Ismailova A.B., Beyshanova M.F., Botabekova T.K. Release of drugs from polymer eye films. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; (7): 233-4. (in Russian)
  21. Gaysina G.Ya., Azamatova G.A., Aznabaev M.T. Ocular drug film as the optimal dosage form for preoperative prevention of infectious complications in ophthalmic surgery. In: *Collection of Materials of the Interregional Scientific-Practical Conference «Topical Issues of Ophthalmology» [Sbornik materialov mezhregional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye voprosy oftal'mologii»]*. Orenburg; 2013: 8-16. (in Russian)
  22. Aznabaev M.T., Gaysina G.Ya., Azamatova G.A., Gabidullin Yu.Z. Evaluation of the effectiveness of preoperative antibiotic prophylaxis in oral ophthalmic surgery. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2015; 10(2): 85-8. (in Russian)
  23. Gaysina G.Ya., Aznabaev M.T., Azamatova G.A., Gabidullin Yu.Z. The study of the therapeutic effect of eye drug films with moxifloxacin on the model of exogenous bacterial inflammation of the eyes. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2015; 10(2): 126-9. (in Russian)
  24. Sarymysakov A.A., Li Yu.B., Rashidova S.Sh. Eye drug films for the treatment of viral eye diseases. In: *Collection of Articles of the VII International Scientific Conference «Priorities in Science and Technology in the XXI Century». Volume 1 [Sbornik statey VII Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Prioritetnye napravleniya v oblasti nauki i tekhnologii v XXI veke». Tom 1]*. Tashkent; 2014: 105-9. (in Russian)
  25. Bilalov E.N., Bakhrudinova F.A., Imomalieva K.M. Evaluation of head of eye drug films GlazAvir in experiment. In: *Russian National Ophthalmological Forum. Volume 2 [Rossiyskiy obshchenatsional'nyy oftal'mologicheskii forum. Tom 2]*. Moscow: Aprel'; 2018: 442-6. (in Russian)
  26. Ershov F.I., Kovalenko A.L., Romantsov M.G., Golubev S.Yu., Vishnev S.G. *Herpetic Infection: Pathogenesis, Methodological Approaches to Therapy [Gerpeticheskaya infektsiya: voprosy patogeneza, metodicheskie podkhody k terapii]*. Moscow; 1997. (in Russian)
  27. Ivanova A.M., Narovlyanskiy A.N., Shevlyagina N.V., Borovaya T.G., Izmest'eva A.V., Gerasimova E.V., et al. Efficacy of the drugs Fortepren and Acyclovir in an experimental model of herpes simplex infection type 2 (genital herpes, HSV-2) in Guinea pigs. In: *Collection of Scientific Articles «Interferon-2011» [Sbornik nauchnykh statey «Interferon-2011»]*. Moscow; 2012: 424-30. (in Russian)
  28. Pshenichnov V.A., Semenov B.F., Zezеров E.G. *Standardization of Virological Research Methods [Standartizatsiya metodov virusologicheskikh issledovaniy]*. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)
  29. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
  30. Bland M. *An Introduction to Medical Statistics*. Oxford: Oxford Medical Publications; 2000.

Поступила 08.11.19

Принята в печать 28.11.19

Догадов Д.И.<sup>1</sup>, Корзая Л.И.<sup>1</sup>, Кюрегян К.К.<sup>2</sup>, Карлсен А.А.<sup>2</sup>, Михайлов М.И.<sup>2</sup>, Лапин Б.А.<sup>1</sup>

## Маркёры гепатита А у обезьян Адлерского приматологического центра

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», 354376, г. Сочи, Россия;<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Гепатит А – широко распространённая вирусная инфекция не только среди людей, но и среди обезьян. Штаммы вируса гепатита А (ВГА) «человеческого» и «обезьяньего» происхождения по своим морфологическим и антигенным свойствам сходны между собой, но отличаются генотипически.

**Целью** исследования было сравнительное изучение серологических и молекулярно-генетических маркёров ВГА-инфекции у обезьян, рождённых в Адлерском приматологическом центре, и обезьян, импортированных из различных регионов мира.

**Материал и методы.** Образцы фекалий ( $n = 313$ ) и сывороток крови ( $n = 266$ ) от различных видов обезьян были изучены с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

**Результаты и обсуждение.** Частота распространения анти-ВГА IgG была высокой как у импортированных животных (зелёные мартышки из Танзании и макаки яванские из Вьетнама) (78,9%), так и у обезьян (макаки резусы, макаки яванские, зелёные мартышки, павианы гамадрилы) Адлерского приматологического центра (88,6%). Вместе с тем у привезённых обезьян маркёры «свежей» ВГА-инфекции (IgM – 27,2%, ВГА-Ag 16,7%, РНК – 22,0%) обнаруживались достоверно чаще ( $p > 0,05$ ), нежели у обезьян, рождённых в питомнике (IgM – 7,5%, Ag-ВГА – 5,2%, РНК – 3,6%). Полученные данные выражали в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>). В целом реактивность анти-IgG варьировала от 1,064 до 2,073 ОП<sub>450</sub>, анти-IgM – от 0,546 до 1,059 ОП<sub>450</sub>. Количество ВГА-Ag составило 0,496–1,995 ОП<sub>450</sub>. РНК ВГА была обнаружена только у макак резусов и макак яванских, рождённых в Адлерском питомнике, а также у импортированных зелёных мартышек.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о широкой циркуляции ВГА как среди обезьян, рождённых в Адлерском приматологическом центре, так и среди импортированных животных. Маркёры «свежей» ВГА-инфекции варьировали в зависимости от вида обезьян и их происхождения.

**Ключевые слова:** гепатит А; обезьяны; анти-ВГА (IgG и IgM); РНК ВГА.

**Для цитирования:** Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И., Лапин Б.А. Маркёры гепатита А у обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 246-249. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-246-249>

### Информация об авторах:

Догадов Д.И., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>Корзая Л.И., <https://orcid.org/0000-0003-2259-5773>Кюрегян К.К., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>Карлсен А.А., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>Михайлов М.И., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>Лапин Б.А., <https://orcid.org/0000-0002-5677-3251>

**Для корреспонденции:** Догадов Дмитрий Игоревич, научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», 354376, г. Сочи; <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>. E-mail: [dima\\_loko86@mail.ru](mailto:dima_loko86@mail.ru)

Dogadov D.I.<sup>1</sup>, Korzaya L.I.<sup>1</sup>, Kyuregyan K.K.<sup>2</sup>, Karlisen A.A.<sup>2</sup>, Mikhailov M.I.<sup>2</sup>, Lapin B.A.<sup>1</sup>

## Markers of hepatitis A in the monkeys of the Adlers primate center

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of Medical Primatology, Sochi, 354376, Russia;<sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia

Hepatitis A is a widespread viral infection. The HAV strains of “human” and “monkey” origin are similar in their morphological and antigenic properties, but differ genotypically. **The aim** of this research was a comparative study of serological and molecular-genetic markers of HAV infection in monkeys born at the Adler Primate Center and in those imported from different countries.

**Material and methods.** Fecal samples ( $n = 313$ ) and serum ( $n = 266$ ) from various species of monkey using ELISA and RT-PCR were studied.

**Results and discussion.** The frequency of anti-HAV-IgG was high (78.9%) in imported animals (vervet monkeys from Tanzania and cynomolgus monkeys from Vietnam) and as well as in various species of monkeys (rhesus monkeys, cynomolgus monkeys, green monkeys and papio hamadryas) of the Center (88.6%). At the same time, in the imported monkeys, the markers of “fresh” HAV infection (IgM-27.2%, Ag-HAV-16.7%, RNA-22.0%) were detected significantly more often ( $p > 0.05$ ) than in monkeys kept at the Colony (IgM-7.5%, HAV-Ag – 5.2%, RNA – 3.6%). In general, anti-IgG reactivity ranged from 1.064 to 2.073 OD<sub>450</sub>, anti-IgM ranged from 0.546 to 1.059 OD<sub>450</sub>. The number of HAV-Ag was 0.496 – 1.995 OD<sub>450</sub>. RNA HAV only in rhesus monkeys and cynomolgus monkeys born at the Colony, as well as in imported vervet monkeys was detected.

**Conclusions.** The data obtained indicate a wide circulation of HAV among monkeys born in the Adler Primate Center and among the imported animals. Markers of “fresh” HAV infection varied depending on the species of monkeys and their origin.

**Keywords:** hepatitis E; non-human primates; anti-HAV (IgG and IgM); HAV RNA.

**For citation:** Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I., Lapin B.A. Markers of hepatitis A in the monkeys of the Adlers primate center. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 246-249. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-246-249>

**For correspondence:** Dmitriy I Dogadov D., is scientist of the laboratory of infection virology at the Scientific Research Institute of Medical Primatology, Sochi, 354376, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>. E-mail: [dima\\_loko86@mail.ru](mailto:dima_loko86@mail.ru)

**Information about authors:**

Dogadov D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>

Korzaya L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2259-5773>

Kyuregyan K.K., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Lapin B.A., <https://orcid.org/0000-0002-5677-3251>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 13 March 2019

Accepted 17 July 2019

## Введение

Гепатит А – широко распространённая антропонозная вирусная инфекция, вызывающая вспышки среди людей [1, 2] и разных видов обезьян [3–10].

Вирус гепатита А (ВГА) обезьян является представителем рода *Hepatovirus*, семейства *Picornaviridae*, порядка *Picornavirales* [11]. Первые сведения о ВГА у обезьян появились в 1950–1970-х годах. [12]. В 1980–1990 гг. с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) была показана высокая частота распространения антител к ВГА среди разных видов обезьян во многих приматологических центрах мира [4, 6, 12]. В нашей стране на материалах Сухумского приматологического центра была продемонстрирована различная циркуляция гепатита А как среди рождённых в питомнике обезьян, так и среди импортированных из мест естественного обитания [5]. В начале 1990-х годов появление методов молекулярной диагностики позволило охарактеризовать штаммы, выделенные от обезьян, и установить генотипические различия между штаммами ВГА «человеческого» и «обезьяньего» происхождения [12, 13].

В настоящее время на основании генетического анализа участка VP1-2A выделяют 6 генотипов ВГА. Генотипы IV, V и VI представлены штаммами, выделенными от низших обезьян Старого Света: IV и VI включают штаммы Cy145 и JM55, выделенные от макак яванских (*Macaca fascicularis*) [13–16], а генотип V представлен штаммами AGM27, IND-SHAV и KibOB-1, выделенными от зелёных мартышек (*Cercopithecus aethiops*), макаки резуса (*Macaca mulatta*) и павиана анубиса (*Papio anubis*) соответственно [7, 14, 17].

**Цель** данной работы – сравнительное изучение серологических и молекулярных маркёров ВГА-инфекции у обезьян Адлерского приматологического центра и обезьян, импортированных в питомник из различных регионов мира (Танзания и Вьетнам).

## Материал и методы

Исследование проводили на базе лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (Сочи). В работе использовали сыворотки крови и фекальные образцы, собранные в 2010–2017 гг. Всего исследовано 313 фекальных образцов и 266 сывороток крови от обезьян,

родившихся и длительно содержащихся в питомнике, а также от импортированных животных.

У обезьян, содержащихся в питомнике, исследовано 229 фекальных образцов и 174 сыворотки крови. Среди обследованных животных были макаки резусы (*Macaca mulatta*), макаки яванские (*Macaca fascicularis*), зелёные мартышки (*Chlorocebus aethiops*) и павианы гамадрилы (*Papio hamadryas*). Также были исследованы 92 сыворотки крови и 84 фекальных образца от обезьян, импортированных в питомник: 40 фекальных образцов и 40 сывороток крови от зелёных мартышек (*Chlorocebus pygerythrus*), поступивших из мест естественного обитания (Танзания, 2014 г.), а также 44 фекальных образца и 52 сыворотки крови от макак яванских (*Macaca fascicularis*), привезённых из вьетнамского питомника (2015 г.). Фекальные образцы собирали на 10-й, а сыворотки крови – на 23-й день после поступления в питомник.

Антитела к ВГА (анти-ВГА) определяли с помощью коммерческих тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-НАV-M» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). ВГА-Аг определяли с помощью тест-системы «ИФА-Аг-ВГА» с подтверждением положительных результатов (ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора), а также использовали тест-систему ИФА-антиген-ВГА-БЕСТ (АО «Вектор Бест», Новосибирская область, р. п. Кольцово). Результаты ИФА учитывали на спектрофотометре «ImmunoChem-2100» (Интермедика сервис, США). Полученные данные выражали в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>).

Детектировали РНК методом полугнездовой полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров к участку VP1-2A [14].

Средние значения показателей в сравниваемых группах определяли с использованием критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2010. Различия оценивали как достоверные при вероятности 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## Результаты

**Маркёры ВГА-инфекции у обезьян, рождённых в Адлерском питомнике (см. таблицу).** Частота распространения анти-ВГА IgG у обезьян, родившихся в Адлерском питомнике, составила 88,6%. Наибольшая частота анти-IgG

отмечена среди павианов гамадрилов (100%), а у макак резусов и макак яванских этот показатель составил 87,3 и 78,1% соответственно. Несмотря на то что у обезьян, родившихся в Адлерском питомнике, антитела класса G выявлялись в 78–100% случаев, показатели острой инфекции – анти-ВГА (IgM), Ag-ВГА и РНК ВГА выявлялись крайне редко. Так анти-ВГА IgM обнаруживались достоверно реже ( $p < 0,05$ ), чем анти-ВГА IgG (7,5 и 88,6% соответственно). Среди макак резусов и макак яванских не наблюдалось значимых отличий в частоте распространения IgM (9,5 и 10,3% соответственно), а у павианов гамадрилов анти-ВГА IgM не обнаружены. Число высоко-реактивных сывороток ( $ОП_{450} > 1,000$ ) среди содержащих анти-ВГА IgM также было невелико: 3 (23%) из 13 положительных образцов, тогда как у серопозитивных животных по IgG это число составило 83 (76%) из 109.

ВГА-Ag были обнаружены в фекалиях 12 (5,2%) из 229 обследованных животных. Положительные особи были выявлены только среди макак резусов (10 (11,2%) из 89) и макак яванских (2 (3,8%) из 53) с низкой реактивностью образцов. Среди зелёных мартышек ( $n = 45$ ) и павианов гамадрилов ( $n = 42$ ) положительные особи не выявлены.

РНК ВГА была обнаружена у 3 (3,6%) из 84 обследованных животных (1 макака яванская и 2 макаки резуса). Возраст животных, в образцах которых содержалась РНК ВГА, варьировал от 2 до 3 лет. Следует отметить, что эти животные содержались на разных участках питомника: макак яванский – в яслях, макаки резусы – в двух разных вольерах.

Маркёры ВГА-инфекции у обезьян, импортированных в Адлерский питомник (см. таблицу). Частота распространения анти-ВГА IgG у привезённых животных практически не отличалась от таковой у обезьян, родившихся в питомнике, и составила 78,9% ( $n = 90$ ). Следует отметить, что среди зелёных мартышек из Танзании частота распространения анти-ВГА IgG была достоверно

выше ( $p < 0,05$ ), чем среди макак яванских из Вьетнама (63,1 и 90,4% соответственно).

Вместе с тем у импортированных обезьян маркёры «свежей» ВГА-инфекции (анти-ВГА-IgM, ВГА-Ag, РНК ВГА) обнаруживались достоверно чаще, чем у обезьян, содержащихся в питомнике. Так, частота распространения анти-ВГА IgM среди двух групп импортированных животных была в 3,6 раза ( $p < 0,001$ ) выше (27,5 и 26,9% у зелёных мартышек и макак яванских соответственно), чем у обезьян, рождённых в Адлерском приматологическом центре. Ещё один показатель, свидетельствующий об острой инфекции, – ВГА-Ag, у импортированных животных также обнаруживался достоверно ( $p = 0,008$ ) чаще (в 3,2 раза), чем у рождённых в питомнике (27,2 и 7,5% соответственно). ВГА-Ag был выявлен в фекалиях 27,5% зелёных мартышек из Танзании, что в 4 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем у макак яванских (6,8%). РНК ВГА (показатель, свидетельствующий не только об острой инфекции, но и об активной репликации вируса) у импортированных животных также выявлялся в 6 раз чаще ( $p = 0,007$ ), чем у рождённых в питомнике обезьян. Среди зелёных мартышек РНК ВГА была выявлена во всех Ag-позитивных фекальных образцах (27,5%), а среди макак яванских не обнаружена.

Специфичность детекции РНК ВГА была подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов величиной 853 нуклеотида от трёх обезьян (номера GenBank: MG458323–MG458325), родившихся в питомнике, и от четырёх зелёных мартышек (номера GenBank: MG417081–MG417084), поступивших из мест естественного обитания (Танзания). Поиск BLAST в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) подтвердил принадлежность амплифицированных последовательностей к участку генома ВГА VP1/2A генотипа V, ранее выделенному от африканских зелёных мартышек, импортированных из Кении [16].

Частота обнаружения маркёров ВГА-инфекции у обезьян различных видов

Происхождение обезьян	Вид обезьян	Маркёры ВГА						РНК
		IgG		IgM		Ag		
		IgG	ОП <sub>450</sub>	IgM	ОП <sub>450</sub>	Ag	ОП <sub>450</sub>	
Рождённые в Адлерском питомнике	Макаки резусы ( <i>Macaca mulatta</i> )	48 / 55* (87,3 ± 4,5)	2,073**	6 / 68 (8,8 ± 3,4)	0,566	10 / 89 (11,2 ± 3,3)	1,036	2 / 47 (4,2 ± 2,9)
	Макаки яванские ( <i>Macaca fascicularis</i> )	25 / 32 (78,1 ± 7,3)	1,817	3 / 34 (8,8 ± 4,8)	1,059	2 / 53 (3,8 ± 2,6)	0,496	1 / 19 (5,3 ± 5,1)
	Зелёные мартышки ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	н. и.***	н. и.	2 / 19 (10,5 ± 7,0)	1,004	0 / 45 (0)	0	0 / 5 (0)
	Павианы гамадрилы ( <i>Papio hamadryas</i> )	36 / 36 (100)	1,572	2 / 53 (3,8 ± 2,6)	0,546	0 / 42 (0)	0	0 / 13 (0)
	Итого...	109 / 123 (88,6 ± 2,8)	1,843	13 / 174 (7,5 ± 2,0)	0,764	12 / 229 (5,2 ± 1,4)	0,946	3 / 84 (3,6 ± 2,0)
Импортированные	Зелёные мартышки ( <i>Chlorocebus pygerythrus</i> ) (Танзания, 2014 г.)	24 / 38 (63,1 ± 7,8)	1,064	11 / 40 (27,5 ± 7,1)	0,874	11 / 40 (27,5 ± 7,1)	1,995	11 / 40 (27,5 ± 7,1)
	Макаки яванские ( <i>Macaca fascicularis</i> ) (Вьетнам, 2015 г.)	47 / 52 (90,4 ± 4,1)	1,716	14 / 52 (26,9 ± 6,1)	0,666	3 / 44 (6,8 ± 3,8)	0,539	0 / 10 (0)
	Итого...	71 / 90 (78,9 ± 4,3)	1,390	25 / 92 (27,2 ± 4,7)	0,770	14 / 84 (16,7 ± 4,1)	1,267	11 / 50 (22,0 ± 5,9)

Примечание. \* число позитивных / число обследованных (% ± m); \*\* среднее значение оптической плотности ОП<sub>450</sub>; \*\*\* не исследованные. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

## Обсуждение

В результате проведённых исследований были охарактеризованы серологические и молекулярно-генетические маркёры ВГА у обезьян Адлерского приматологического центра и импортированных животных из различных регионов мира (Танзания, Вьетнам).

Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте распространения анти-ВГА-IgG как у импортированных животных (78,9%), так и у обезьян, рождённых в питомнике (88,6%). Вместе с тем у импортированных животных маркёры «свежей» ВГА-инфекции (IgM – 27,2%, ВГА-Ag – 16,7%, РНК – 22,0%) обнаруживались достоверно чаще ( $p > 0,05$ ), чем у обезьян, содержащихся в питомнике (IgM – 7,5%, ВГА-Ag – 5,2%, РНК – 3,6%).

Низкая частота показателей острой инфекции у обезьян Адлерского приматологического центра, повидимому, обусловлена тем, что среди обследованных обезьян преобладали особи старше 3 лет, а как показывает практика, почти все обезьяны к 1,5–2 годам являются серопозитивными к ВГА [3].

Выявление маркёров «свежей» ВГА-инфекции у зелёных мартышек из Танзании свидетельствует об их недавнем инфицировании. Вместе с тем позднее взятие материалов для исследования (проб фекалий на 10-й, а проб сывороток – на 23-й день после поступления) не позволяет точно определить источник и место заражения обезьян. Животные могли инфицироваться как в местах их концентрации после отлова, что часто происходит с обезьянами в местах их естественного обитания, так и в Адлерском питомнике, где ВГА постоянно циркулирует среди обезьян различных видов [3].

Высокая частота распространения ВГА IgG (90,4%) и низкая ВГА IgM (11,4%) среди макак яванских из Вьетнама может быть связана с тем, что они были привезены из питомника, в котором, вероятно, как и в Адлерском приматологическом центре, циркулирует ВГА [18].

В ходе исследования нами идентифицировано три изолята от обезьян, родившихся и длительно содержащихся в Адлерском питомнике, а также четыре изолята от зелёных мартышек из Танзании. Молекулярный анализ образцов показал гомологию всех нуклеотидных последовательностей со штаммом AGM-27 (95%), что подтверждает принадлежность выявленных изолятов к генотипу V ВГА [16].

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

## ЛИТЕРАТУРА (1, 2, 4-6, 10, 12-17 см. REFERENCES)

- Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевич З.К., Яковлева Л.А. *Проблемы инфекционной патологии обезьян*. М.: РАМН; 2004.
- Анджапаридзе А.Г., Каретный Ю.В., Корзая Л.И., Балаян М.С., Титова И.П., Замятина Н.А. Эпизоотия гепатита А среди африканских зелёных мартышек, содержащихся в условиях вивария. *Вопросы вирусологии*. 1989; 34(3): 292-6.
- Анджапаридзе А.Г., Шевцова З.В., Корзая Л.И. Признаки естественной инфекции гепатита А у бурых макак. *Вопросы вирусологии*. 1987; 32(5): 541-4.
- Корзая Л.И., Шевцова З.В., Джелиева З.Н., Крылова Р.И., Белова Е.Г., Чалаян В.Г. Спонтанный и экспериментальный гепатит А у павианов гамадрилов. *Вопросы вирусологии*. 1992; 37(3-4): 187-91.
- Львов Д.К. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.

- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончарко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркеры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии»*. Сочи; 2011: 79–88.

## REFERENCES

- Bose M., Bose S., Saikia A., Medhi S., Deka M. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infection in Northeast India. *J. Med. Virol.* 2015; 87(7): 1218-24. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.24168>
- Gargouri S., Berrajah L.F., Ayadi I., Messedi E., Jallouli H., Hammami A., et al. Epidemiological and clinical analysis of hepatitis virus A infections during three successive outbreaks in Sfax (Tunisia) between 2007 and 2010. *Med. Sante. Trop.* 2016; 26(2): 159-64. Doi: <https://doi.org/10.1684/mst.2015.0491>
- Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Krylova R.I., Stasilevich Z.K., Yakovleva L.A. *Problems of Infectious Pathology of Monkeys [Problemy infektsionnoy patologii obez'yan]*. Moscow: RAMN; 2004. (in Russian)
- Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W. Viral infections of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1997; 47(5): 461-8.
- Korzaya L.I., Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krilova R.I. Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys are the models of human hepatitis A. *Baltic. J. Lab. Animal. Sci.* 2001; 11: 135-41.
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161-77. Doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.161>
- Andzhaparidze A.G., Karetnyy Yu.V., Korzaya L.I., Balayan M.S., Titova I.P., Zamyatina N.A. Epizootic hepatitis A among African green monkeys kept in a vivarium. *Voprosy virusologii.* 1989; 34(3): 292-6. (in Russian)
- Andzhaparidze A.G., Shevtsova Z.V., Korzaya L.I. Signs of natural infection with hepatitis A in brown macaques (Macaca arctoides). *Voprosy virusologii.* 1987; 32(5): 541-4. (in Russian)
- Korzaya L.I., Shevtsova Z.V., Dzhelieva Z.N., Krylova R.I., Belova E.G., Chalyan V.G. Spontaneous and experimental hepatitis A in Papio hamadryas. *Voprosy virusologii.* 1992; 37(3-4): 187-91. (in Russian)
- Shevtsova Z.V., Lapin B.A., Doroshenko N.V., Krilova R.I., Korzaya L.I., Lomovskaya I.B., et al. Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys. *J. Med. Primatol.* 1988; 17(4): 177-94.
- L'vov D.K. *Virology Guide: Human and Animal Viruses and Viral Infections [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
- Robertson B.H. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and nonhuman primate hepatitis A, B, and the GB-related viruses. *J. Viral. Hepat.* 2001; 8(4): 233-42. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2001.00295.x>
- Costa-Mattioli M., Di Napoli A., Ferre V., Billaudel S., Perez-Bercoff R., Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 2003; 84(Pt. 12): 3191-201. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19532-0>
- Arankalle V.A., Ramakrishnan J. Simian hepatitis A virus derived from a captive rhesus monkey in India is similar to the strain isolated from wild African green monkeys in Kenya. *J. Viral. Hepat.* 2009; 16(3): 214-18. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01060>
- Cristina J., Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus. Res.* 2007; 127(2): 151-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.005>
- Dogadov D.I., Korzaya L.I., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K. Molecular genetic identification of isolates of the hepatitis A virus (HAV) from monkeys at Adler Primate Center. *J. Med. Primatol.* 2018; 47(2): 87-92. Doi: <https://doi.org/10.1111/jmp.12333>
- Bennett A.J., Sibley S.D., Lauck M., Weny G., Hyeroba D., Tumukunde A., et al. Naturally Circulating Hepatitis A Virus in Olive Baboons, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1308-10. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2207.151837>
- Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd International Scientific Conference «Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology» [Materialy vtoroy mezhduнародnoy nauchnoy konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoй primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. (in Russian)

Поступила 13.03.19

Принята в печать 17.07.19

© ЛЕОНОВА Г.Н., БЕЛИКОВ С.И., 2019

Леонова Г.Н.<sup>1</sup>, Беликов С.И.<sup>2</sup>

## Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа (*Flaviridae*, *Flavivirus*, TBEV-FE) на территории Азии

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток, Россия;<sup>2</sup>ФГБНУ Лимнологический институт СО РАН, 664033, г. Иркутск, Россия

К настоящему времени появилось много данных по особенностям молекулярно-генетической характеристики разных штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Только на основе генома белка E в GenBank зарегистрированы последовательности около 1500 штаммов ВКЭ.

**Цель работы** – ревизия и сравнительный анализ данных о полных геномах штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа, распространённых на азиатской территории континента.

**Материал и методы.** Использованы данные о полных геномах 84 штаммов ВКЭ, изолированных на территории Азии, проведён филогенетический анализ.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что здесь циркулируют варианты ВКЭ дальневосточного субтипа, которые подразделяются на три кластера (Sofjin-, Senzhang- и Shkotovo-подобных штаммов). Штамм Sofjin (Sofjin-1953, Sofjin-Chumakov, Sofjin-KSY) является эталонным для ВКЭ дальневосточного субтипа, а также для кластера Sofjin-подобных штаммов. Sofjin-подобные штаммы не встречаются в Китае и Японии, но широко распространены на территории Приморского и Хабаровского краёв. Группа Senzhang-подобных штаммов распространена в Китае, Восточной Сибири, в Хабаровском крае и на севере Приморского края, однако не встречается на о. Хоккайдо (Япония). Самой молодой, генетически более однородной группой по молекулярно-генетической характеристике оказались Shkotovo-подобные штаммы, выделенные на юге Приморского края и на о. Хоккайдо.

**Заключение.** Ревизия полногеномной характеристики штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа позволила выявить особенности микроразнообразия вируса в Азиатском регионе и показать индивидуальную привязанность штаммов к определённым территориям, а также обнаружить случайные находки таких штаммов на территориях других природных очагов.

**Ключевые слова:** полногеномное секвенирование; штаммы вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа; территориальная принадлежность; Азия.

**Для цитирования:** Леонова Г.Н., Беликов С.И. Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа (*Flaviridae*, *Flavivirus*, TBEV-FE) на территории Азии. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 250-256.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256>

### Информация об авторах:

Леонова Г.Н., <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>Беликов С.И., <https://orcid.org/0000-0001-7206-8299>

**Для корреспонденции:** Леонова Галина Николаевна, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток; <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>. E-mail: [galinaleon41@gmail.com](mailto:galinaleon41@gmail.com)

Leonova G.N.<sup>1</sup>, Belikov S.I.<sup>2</sup>

## Phylogenetic analysis and distribution of far eastern tick-borne encephalitis virus subtype (*Flaviridae*, *Flavivirus*, TBEV-FE) from Asia

<sup>1</sup>Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia;<sup>2</sup>Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033, Russia

To date, a lot of data on molecular genetic characteristics of different tick-borne encephalitis virus strains has appeared. Only on the basis of the E protein genome, sequences of about 1,500 TBEV strains were registered in GenBank.

**The purpose** of the work – revision and comparative analysis of data on complete genomes sequences of the Far Eastern subtype of TBE virus strains distributed in the Asian part of Eurasian continent.

**Material and methods.** The data on the complete genomes of 84 strains of TBEV isolated in Asia were used; phylogenetic analysis was performed.

**Results and discussion:** it was shown that variants of the TBEV of the Far Eastern subtype are circulating here and form three separate clusters (Sofjin, Senzhang- and Shkotovo-like strains). Sofjin strain (Sofjin-1953, Sofjin-Chumakov, Sofjin-KSY) was considered to be the reference for Far Eastern TBE virus subtype strains and a cluster of Sofjin-like strains. Sofjin-like strains were not found in China and Japan, but widely distributed throughout the area of Primorsky and Khabarovsk krai. The group of Senzhang-like strains was distributed in China, Eastern Siberia, Khabarovsk krai and northern Primorsky krai, but was not found in Japan (Hokkaido). According to molecular genetic characteristics the youngest and more genetically homogeneous group was the Shkotovo-like strains, isolated in the southern part of Primorsky krai, however not found on Hokkaido Island (Japan).

**Conclusion:** revision of the complete genome characteristics of TBEV strains revealed the features of micro-evolutionary process of viral populations in the Asian part of Eurasia, show the individual affection of strains to certain territories, as well as detect random finds of such strains in the territories of other natural foci.

**Keywords:** whole genome sequencing; Far Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains; geographic association; Asia.

**For citation:** Leonova G.N., Belikov S.I. Phylogenetic analysis and distribution of far eastern tick-borne encephalitis virus subtype (Flaviridae, Flavivirus, TBEV-FE) from Asia. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 250-256. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256>

**For correspondence:** Galina N. Leonova, MD, Professor, Principal Researcher of the Laboratory of Flavivirus Infections of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>. E-mail: galinaleon41@gmail.com

**Information about authors:**

Leonova G.N., <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Belikov S.I., <https://orcid.org/0000-0001-7206-8299>

**Acknowledgments.** The authors thank Professor Konstantin Mikhailovich Chumakov for discussions and editorial suggestions. This work was supported by grants 0545-2014-0011 from the Federal Agency for Scientific Organizations.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 09 December 2018

Accepted 16 February 2019

## Введение

В 1990-х годах на всей территории Евразийского континента произошёл резкий подъём заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ), что способствовало активизации научного интереса к изучению вирусной популяции. В эти годы стали внедрять молекулярно-генетические методы исследований, которые постепенно открывали эколого-филогенетические «тайны» в характеристике популяции вируса КЭ (ВКЭ), широко распространённого на Евразийском континенте – от берегов Тихого океана до Атлантического. Первоначально использовали более простой и доступный метод молекулярной гибридизации, с помощью которого была установлена генетическая неоднородность популяции ВКЭ [1, 2]. Затем стали применять метод секвенирования небольшого фрагмента белка Е, который не давал представления о вариативности структуры штаммов ВКЭ. Даже на основе полного генома белка Е (к настоящему моменту в GenBank зарегистрированы последовательности белка Е около 1500 штаммов ВКЭ) не всегда удаётся получить полноценное представление о различиях штаммов ВКЭ. И только на основании изучения полного генома штаммов ВКЭ можно получить достоверные данные об особенностях молекулярно-генетической характеристики вирусной популяции [3].

Определение нуклеотидной последовательности стало незаменимой основой как для изучения признанных в настоящее время видов вирусов, так и для идентификации и характеристики новых вирусов. Согласно мнению экспертов International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [4], ВКЭ относится к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*. В 1990 г. впервые был прочитан полный геном ВКЭ [5], для чего был избран штамм Sofjin, изолированный в 1937 г. из мозга умершего пациента, заражение которого произошло на территории Приморского края (Дальний Восток России). Штамм Sofjin стал классическим для всех штаммов ВКЭ, а затем по мере накопления результатов молекулярно-генетического исследования штаммов на разных территориях Евразийского континента он стал эталонным для группы штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа. Установлено, что ВКЭ содержит геном РНК положительной полярности длиной около 11 000 оснований, который кодирует один белок – полипротеин длиной 3414 аминокислотных остатков, состоящий из 10 белков, три из которых являются структурными (М, С, Е), а остальные (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) неструктурными. На осно-

вании биологических и молекулярно-генетических особенностей штаммов ВКЭ [6], по данным Доклада ICTV [7], были признаны три субтипа (I – дальневосточный, II – европейский и III – сибирский). Они не имеют формально признанного таксономического значения, однако могут содержать полезную информацию об этих группах штаммов, доминирующих на разных территориях континента.

В ранее опубликованных работах [3, 8], посвящённых изучению ВКЭ, мы показали, что на основе филогенетического анализа дальневосточные штаммы были подразделены на три кластера. Образующими кластер были определены штамм Sofjin [9], штамм Senzhang, выделенный в 1953 г. на территории Хэйлуцзянской провинции Китая [10], и штамм Oshima, впервые выделенный в 1997 г. на территории о. Хоккайдо (Япония) [11].

**Цель работы** – проведение ревизии и сравнительного анализа известных к настоящему времени данных о полных геномах штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа, распространённых на азиатской территории Евразийского континента.

## Материал и методы

В анализ включены 84 изолята с полногеномной характеристикой, зарегистрированные в GenBank. В исследуемые группы вошли 6 штаммов из Китая (*JQ650523*, Senzhang; *JX534167*, Xinjiang-01; *JF316707*, MDJ-02; *JF316708*, MDJ-03; *AY217093*, MDJ-01; *KJ755186*, WH2012), 2 – из Японии (*AB062063* Oshima 5-10; *AB753012* Oshima 08-As), 5 – из Иркутской области и Забайкалья (*JN003205* Irkutsk-1861; *KF951037*, 4072; *JX968560* Zabaikalye-1-98; *KF826915* Zabaikalye\_6-09; *KC422667* Zabaikalye 30-00), 15 – из Хабаровского края (*DQ989336*, 205; *KF880803*, 9024; *KF880804*, 8696; *KF880805*, 1230; *KJ744034*, Malishevo; *KP844724*, Chichagovka 1222; *KP844725*, Chichagovka 1223; *KP844726*, Birobidzhan 1354; *KP844727*, Birobidzhan 1357; *KP869172*, Nikolaevsk 855; *KT001070*, Khekhtzir 9-13; *KT001071*, Khekhtzir 10-13; *KT001072*, Khekhtzir 17-13; *KT001073*, *AB062064*, SofHO; Lazo MP36), 50 – из Приморского края (*AY169390*, Primorye-332; *DQ862460*, Glubinnoe/2004; *EU816450*, Primorye-212; *EU816451*, Primorye-253; *EU816452*, Primorye-270; *EU816453*, Primorye-69; *EU816454*, Primorye-94; *EU816455*, Primorye-86; *FJ402885*, Kavalerovo; *FJ402886*, Dalnegorsk; *FJ906622*, Primorye-89; *FJ997899*, Primorye-90; *GQ228395*, Primorye-18; *GU121642*, Svetlogorie; *HM859894*, Primorye-633;

HM859895, Primorye-2239; HQ201303, Primorye-92; HQ901366, Primorye-1153; HQ901367, Primorye-501; JQ825144, Primorye-828; JQ825145, Primorye-895; JQ825146, Kiparis-94; JQ825147, Shkotovo-94; JQ825148, Primorye-82; JQ825149, Primorye-87; JQ825150, Primorye-91; JQ825151, Spassk-72; JQ825152, Primorye-75; JQ825153, Primorye-183; JQ825154, Primorye-52; JQ825155, Primorye-196; JQ825156, Primorye-739; JQ825157, Primorye-202; JQ825158, Primorye-208; JQ825159, Primorye-274; JQ825160, Primorye-320; JQ825161, Primorye-345; JQ825162, Primorye-437; JQ825163, Primorye-750; JQ825164, Primorye-823; KU761567, Golubnichiy; KU761568, Primorye-512;

KU761569, Primorye-696; KU761570, Primorye-949; KU761571, 1001; KU761572, Primorye-1035; KU761573, Primorye-1056; KU761574, Primorye-1284; KU761575, Primorye-1285), 5 – из Томской области (KJ739730, Tomsk-K6; KM019546 Tomsk-PT12; KJ739731, Tomsk-M83; KJ914683, Tomsk-M202; KJ914682, Tomsk-PT14) и 1 – из Новосибирской области (KJ739729, Novosibirsk-L2008). Кроме того, в числе исследуемых штаммов представлена группа из шести изолятов с именем Sofjin (KU761576, Sofjin-1953; KC806252, Sofjin-Chumakov; JF819648, SofjinKSY; JX498940 Sofjin (Vector); AB062064 Sofjin-НО и SofjinPYB), зарегистрированных в GenBank. Изолятом SofjinPYB назван нами первый из-

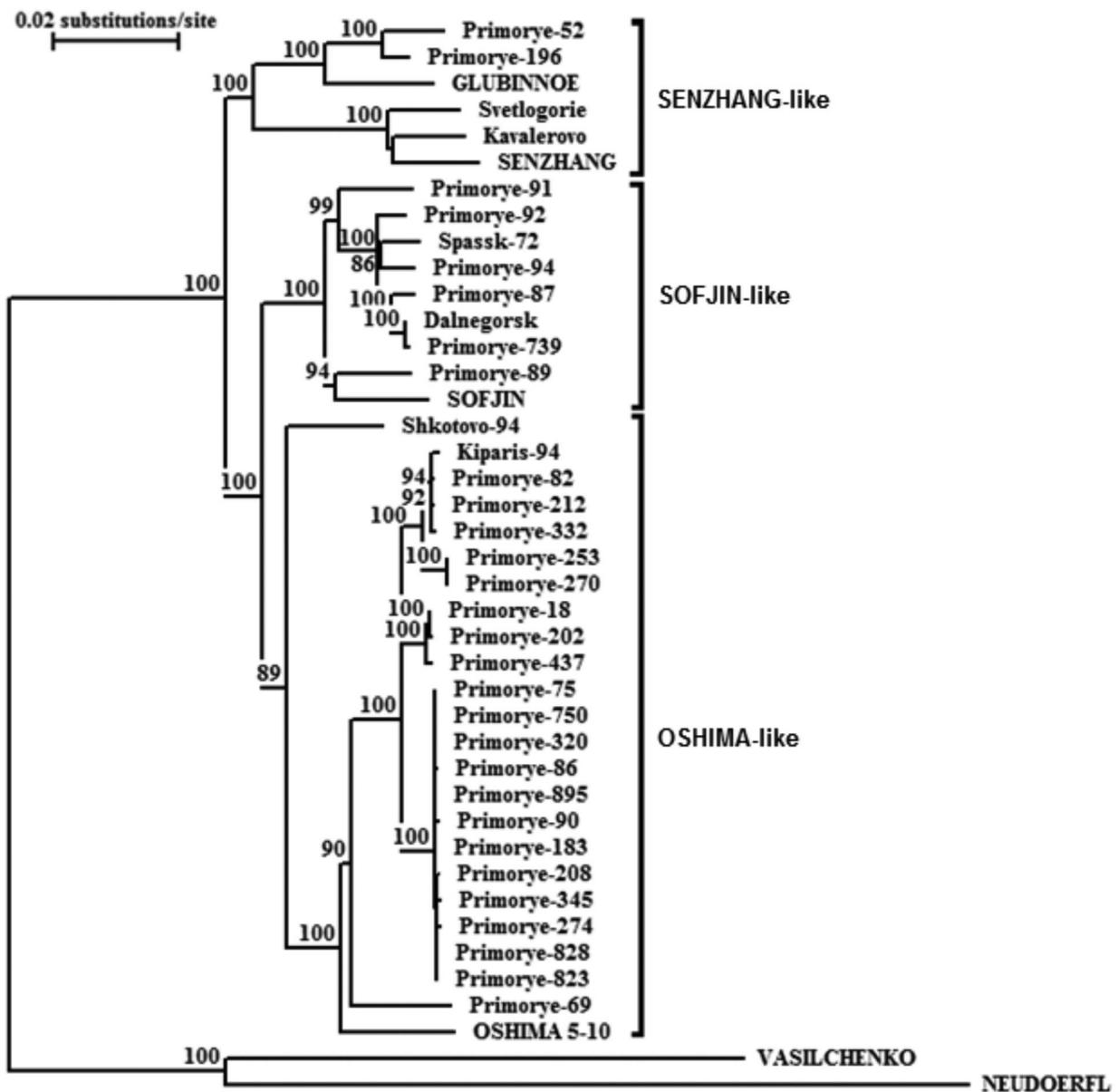


Рис. 1. Филогенетическое дерево штаммов Приморского края, построенное на основе полногеномного секвенирования с указанием уровня гомологии.

вестный вариант последовательности ВКЭ, прочитанный А.Г. Pietnev и соавт. [5], но не опубликованный в GenBank и реконструированный нами из различных источников.

Выравнивали последовательности с использованием пакета MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>, [12]). Филогенетическое древо Neighbor-Joining, Model JTT, основанное на анализе транслированных последовательностей полипротеина ВКЭ, построено по О. Robinson и соавт. [13]. В качестве аутгруппы выбрана последовательность штамма Aina, acc# JN003206 – первого изолята ВКЭ сибирского субтипа [14].

### Результаты

Для проведения филогенетического анализа использованы данные о полных геномах 84 штаммов ВКЭ, изолированных на азиатской территории Евразийского континента.

В таблице показана принадлежность изолированных на разных территориях континента штаммов ВКЭ к разным кластерам. Штаммы ВКЭ из Приморского края распределены по всем кластерам, что указывает на выраженную гетерогенность их молекулярно-генетической структуры.

Ранее при проведении филогенетического анализа штамм Shkotovo-94 занимал промежуточную позицию между кластерами (рис. 1).

При дополнении анализируемых штаммов стало ясно, что образующим кластер здесь следует считать не штамм Oshima 5-10, как это было принято нами ранее [3], а штамм Shkotovo-94. Название этой группы было изменено на Shkotovo-подобные штаммы.

На рис. 2 представлена схема филогенетического дерева, включающая 84 изолята, на которой выделены жирным шрифтом образующие кластер штаммы (Senzhang, Sofjin и Shkotovo-94).

Кластер Senzhang-подобных штаммов образуют 6 китайских изолятов, располагающихся на двух самостоятельных веточках. Отдельную ветвь образуют 3 штамма из Забайкалья. Кроме того, значительную группу (6 изолятов) представляют штаммы, в большинстве своём изолированные на севере Приморского края, и один штамм Laso\_MP36, изолированный на территории Хабаровского края. Причём самостоятельные веточки образовали штаммы, выделенные из мозга умерших людей в Приморском крае (Glubinnoe, Svetlogorye, Kavalerovo) и в Китае (Senzhang).

Самую значительную группу (41 штамм) представляют Sofjin-подобные штаммы. Прежде всего, следует остановиться на группе из 6 штаммов, имеющих название Sofjin. Ранее нами была дана молекулярно-генетическая характеристика группе штаммов Sofjin, имеющих широкое научно-диагностическое применение во многих вирусологических лабораториях России и за рубежом [8]. По данным структуры белка Е было показано, что штаммы Обор-4 и Софьин-НО идентичны, но не принадлежат к штамму Sofjin. Они являются представителями группы возбудителей из Хабаровского края и входят в кластер Sofjin-подобных штаммов. В коллекциях российских штаммов определились три генетически близких штамма ВКЭ Sofjin1953, SofjinKSV и SofjinChu, которые могут номинировать единый штамм Sofjin. Группа изолятов, состоящая из двух штаммов (4072 и Иркутск-1861), выделенных в Прибайкалье, также вошла в кластер Sofjin-подобных штаммов. Причём штамм Иркутск-1861 вызвал очаговую форму КЭ с летальным исходом [15]. Эти два штамма ВКЭ показали идентичность приморскому штамму Sofjin, но нетипичность для территории Иркутской области.

Сформировалась группа случайных находок штаммов ВКЭ, которая на филогенетическом дереве состоит из пяти томских штаммов и одного новосибирского (Novo-L2008). Они идентичны штамму 205, выделенному из *I. persulcatus*, и штамму 9024 – из *H. concinna*, выделенным в Хабаровском крае, т. е. эти штаммы ВКЭ представляют типичную группу возбудителей, распространённых в Хабаровском крае.

Для всех других Sofjin-подобных штаммов нами выявлена характерная географическая привязанность к местам их изоляции. Не нарушают эту закономерность штаммы, выделенные в Приморском или в Хабаровском крае, которые формируют на филогенетическом дереве самостоятельные территориально привязанные веточки. Штаммы, изолированные в 1958–1960 гг. (Primorye-1285, Primorye-1056, Primorye-949, Primorye-1035, Primorye-696), не нарушили это правило, не смешиваясь с другими приморскими штаммами, они сформировали самостоятельную ветвь. Кроме того, в эту группу вошли штаммы, выделенные не только из клещей, но и из мозга умерших людей с очаговыми формами КЭ на территории Приморского края (Primorye-89, Primorye-87, Primorye-739, Dal'negorsk, Primorye-92, Primorye-94, Spassk-72, Primorye-91, Primorye-1035, Primorye-696).

Распределение проанализированных штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) дальневосточного субтипа на азиатской территории Евразийского континента

Территории изоляции изучаемых штаммов ВКЭ	Кластеры штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа		
	Senzhang-подобные	Sofjin-подобные	Shkotovo-подобные
Хэйлуцзянская провинция (Китай)	6	0	0
Прибайкалье, Восточная Сибирь (Россия)	3	2	0
Юго-западная Сибирь (Россия):			
Томская область	0	5	0
Новосибирская область	0	1	0
Северная очаговая территория Дальнего Востока, Хабаровский край (Россия)	1	14	0
Южная очаговая территория Дальнего Востока, Приморский край (Россия)	6	19	25
о. Хоккайдо (Япония)	0	0	2
Всего...	16	41	27

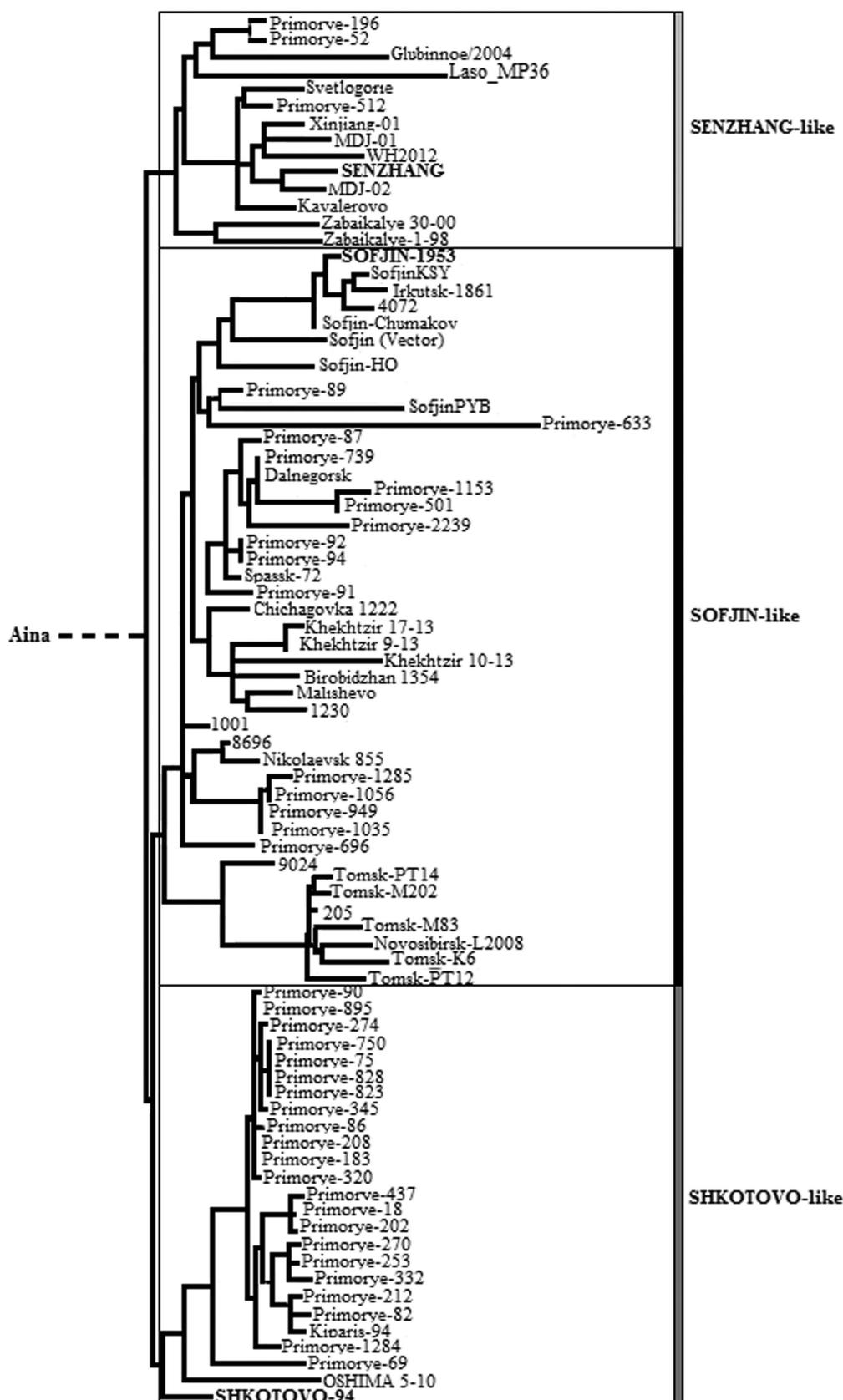


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе полногеномного секвенирования 84 штаммов вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа.

Прописными буквами жирным шрифтом выделены штаммы, образующие кластер (Senzhang, Sofjin и Shkotovo-94).

Более однородной оказалась группа Shkotovo-подобных штаммов, которая представлена 27 изолятами (см. таблицу). На филогенетическом дереве эта группа включает самостоятельную веточку, состоящую из двух штаммов Oshima, и большую ветвь из 24 штаммов, изолированных на юге Приморского края, чаще всего из крови лиц с инаппарантной и лихорадочной формами КЭ, а также в единичных случаях (штаммы Primorye-86 и Golubnichiy) из мозга умерших больных КЭ.

### Обсуждение

Накопленные знания по особенностям молекулярно-генетической характеристики ВКЭ позволили разрешить давний спор ряда исследователей, которые считали, что в природных очагах западных европейских территорий России циркулирует самостоятельный вид ВКЭ [16, 17]. Идентификация трёх субтипов (дальневосточного, западно-европейского и сибирского) ВКЭ подразумевает распространённость различных штаммов единого вида этого возбудителя на территории Евразийского континента [7] и даёт основание признать КЭ в разных регионах единой нозологической формой болезни [18].

Анализ информации по полногеномной структуре большого числа штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа представил возможность рассмотреть филогенетические особенности, характеризующие непрерывно происходящие процессы микроэволюции этой группы возбудителя. Прежде всего проанализированная нами группа из 84 штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа на филогенетическом дереве дополнительно подразделена на три кластера, которые можно рассматривать как разные классы популяции возбудителя одного вида. С точки зрения экологии отдельные классы популяции различных видов – сочленов природного очага (иксодовые клещи, мелкие грызуны и другие прокормители клещей) ограничены географическими рубежами (крупные реки, горные хребты и т. п.) и занимают определённые территории [19]. Так, на основании материалов районирования ареала таёжного клеща на территории Евразийского континента Э.И. Коренберг [19] выделяет 59 региональных комплексов популяции клеща, что, по нашему мнению, безусловно оказывает влияние на формирование гетерогенности популяции ВКЭ. В этой связи ареал таёжного клеща подразделяют [20] на 5 территорий: восточно-европейскую, западно-сибирскую, среднеазиатскую, хинганско-приамурскую и притихоокеанскую.

В то же время основным сочленом природного очага КЭ является его возбудитель – вирус, к особенностям которого также относится территориальная привязанность, о чём свидетельствует доказательная база, полученная нами на материале дальневосточной популяции ВКЭ. На основании молекулярно-генетического анализа полного генома штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа показана приуроченность распространения их на среднеазиатских, хинганско-приамурских и притихоокеанских территориях Евразийского континента. На рис. 2 показано расположение образующих кластер штаммов: Senzhang (Хэйлунцзянская провинция, Китай), Sofjin (средняя территория Сихотэ-Алиня, Приморский край, Россия), Shkotovo (южная территория Приморского края, Россия).

Во всех кластерах выявлена характерная особенность: штаммы из разных регионов, систематизирующиеся на филогенетическом дереве в виде отдельных ветвей, при-

вязываются к определённым локальным территориям, на которых не обнаружены штаммы из других регионов. Такая закономерность территориальной приуроченности штаммов прослеживается во всех трёх кластерах. В то же время полногеномный анализ штаммов выявил несколько исключений. К ним относится появление штамма Sofjin-НО (на самом деле это штамм Obog-4, выделенный в 1937 г. сотрудниками Северного отряда первой экспедиции под руководством Л.А. Зильбера в Хабаровском крае). К таким исключениям следует отнести также выявление Хабаровского штамма 205 в Томской и Новосибирской областях, а также появление штаммов Irkutsk-1861 и 4072, подобных Sofjin KSB, в Иркутской области. Анализируя молекулярно-генетическую характеристику вирусной популяции, следует учитывать географическую привязанность изучаемых штаммов к местам их изоляции.

Молекулярно-генетическая характеристика штамма Sofjin-1953 была изучена на самой ранней пассажной истории культивирования этого штамма [8, 21]. В дальнейшем для получения сравнительных данных по молекулярно-генетической характеристике штаммов ВКЭ из разных регионов можно проводить анализ относительно этого штамма Sofjin-1953. Нами показана выраженная генетическая вариабельность группы Sofjin-подобных штаммов, которые не встречаются в Китае и в Японии, но широко распространены на территории Приморского и Хабаровского краёв и представляют наибольшую опасность в возникновении тяжёлых форм КЭ.

Группа Senzhang-подобных штаммов распространена в Китае, в Восточной Сибири, в Хабаровском крае и на севере Приморского края и не встречается на о. Хоккайдо (Япония).

Самой молодой, более однородной группой по молекулярно-генетической характеристике оказались Shkotovo-подобные штаммы, ранее называемые кластером Oshima-подобные [3, 22]. В большинстве случаев эти штаммы были изолированы из крови лиц с инаппарантной и лихорадочной формой КЭ. В исключительных случаях они могут также вызывать тяжёлые формы КЭ как на юге Приморского края [22, 23], так и на о. Хоккайдо (Япония) [11].

### Выводы

1. Филогенетический анализ данных полных геномов 84 штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа, изолированных на территории Азии, позволил разделить их на три кластера: Sofjin-, Senzhang- и Shkotovo-подобные.

2. Показаны особенности географического распределения штаммов этих кластеров не только на определённых территориях азиатского региона, но и индивидуальная привязанность разных групп штаммов к локальным территориям природных очагов ВКЭ.

3. Выявлена возможность верификации случайных находок таких штаммов на других территориях природных очагов ВКЭ.

**Благодарность.** Авторы благодарят Константина Михайловича Чумакова за обсуждения и редакционные предложения.

**Финансирование.** Работа была поддержана грантами 0545-2014-0011 от Федерального агентства научных организаций.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-8, 10-13, 15, 21, 22  
см. REFERENCES)

2. Злобин В.И., Мамаев Л.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В. Генетические типы вируса клещевого энцефалита. *Журнал инфекционной патологии*. 1996; 3(4): 13-7.
9. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит. *Архив биологических наук*. 1939; 56(2): 9-37.
14. Краминская Н., Живовляпина Р.Р., Мейерова Р.А., Перевозчиков В.А. Своеобразный штамм вируса клещевого энцефалита, выделенный от больного с прогрессивным течением заболевания. В кн.: *Материалы конференции «Актуальные проблемы вирусных инфекций»*. М.; 1965: 190-1.
16. Вотяков В.И., Протас И.И., Жданов В.М. *Западный клещевой энцефалит*. Минск; 1978.
17. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. *Клещевые энцефалиты Евразии*. Новосибирск: Наука; 2002.
18. Леонова Г.Н. О нозологической однородности и эволюции клещевого энцефалита. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; (3): 19-22.
19. Коренберг Э.И. *Биохорологическая структура вида*. М.: Наука; 1979.
20. Коренберг Э.И., Лебедева Н.Н. Районирование ареала таежного клеща *Ixodes persulcatus*. *Зоологический журнал*. 1976; 55(10): 1468.
23. Леонова Г.Н. *Клещевой энцефалит в Приморском крае*. Владивосток: Дальнаука; 1997.
9. Zil'ber L.A. Spring (Spring-Summer) endemic tick-borne encephalitis. *Arkiv biologicheskikh nauk*. 1939; 56(2): 9-37. (in Russian)
10. Zhang Y., Si B.Y., Liu B.H., Chang G.H., Yang Y.H., Huo Q.B., et al. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res*. 2012; 167(2): 310-3. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.015>
11. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hayasaka D., Sato T., Takezawa C., et al. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(8): 1943-7.
12. Kuraku S., Zmasek C.M., Nishimura O., Katoh K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(W1): W22-8. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>
13. Robinson O., Dylus D., Dessimoz C. Phylo.io: interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(8): 2163-6. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw080>
14. Kraminskaya N., Zhivolyapina R.R., Meyerova R.A., Perevozchikov V.A. Unusual strain of Tick-borne encephalitis virus, isolated from a patient with progressive chronic disease. In: *Materials of the Conference «Actual Problems of Viral Infections» [Materialy konferentsii «Aktual'nye problemy virusnykh infektsiy»]*. Moscow; 1965: 190-1. (in Russian)
15. Kulakova N.V., Andaev E.I., Belikov S.I. Tick-borne encephalitis virus in Eastern Siberia: complete genome characteristics. *Arch. Virol.* 2012; 157(11): 2253-5. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1412-x>
16. Votyakov V.I., Protas I.I., Zhdanov V.M. *Western Tick-Borne Encephalitis [Zapadnyy kleshchevoy entsefalit]*. Minsk; 1978. (in Russian)
17. Votyakov V.I., Zlobin V.I., Mishaeva N.P. *Tick-Borne Encephalitis of Eurasia [Kleshchevye entsefalit Evrazii]*. Novosibirsk: Nauka; 2002. (in Russian)
18. Lеонова G.N. On nosological homogeneity and evolution of tick-borne encephalitis virus. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; (3): 19-22. (in Russian)
19. Korenberg E.I. *Biochorological Structure of the Species [Biokhorologicheskaya struktura vida]*. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
20. Korenberg E.I., Lebedeva N.N. Zoning of the area of taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Zoologicheskij zhurnal*. 1976; 55(10): 1468. (in Russian)
21. Vorovitch M.F., Kozlovskaya L.I., Romanova L.Yu., Chernokhaeva L.L., Ishmukhametov A.A., Karganova G.G. Genetic description of a tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with the longest history as a vaccine strain. *SpringerPlus*. 2015; 4: 761. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1561-y>
22. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of TBEV strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443(1): 89-98. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.029>
23. Leonova G.N. *Tick-Borne Encephalitis Virus in Primorsky Krai [Kleshchevoy entsefalit v Primorskom krae]*. Vladivostok: Dal'nauka; 1997. (in Russian)

## REFERENCES

1. Leonova G.N., Kozhemyako V.B., Borisevich V.G., Takashima I., Marinin D.V. Molecular-genetic basis of heterogeneity of the Far East population of tick-borne encephalitis virus. In: *Proceeding of the 3rd International Conference «Ticks and tick-borne Pathogens: Into the 21st Century»*. Bratislava, Slovakia; 2000.
2. Zlobin V.I., Mamaev L.V., Dzhiоеv Yu.P., Kozlova I.V. Genetic types of tick-borne encephalitis virus. *Zhurnal infektsionnoy patologii*. 1996; 3(4): 13-7. (in Russian)
3. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94946. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Release, EC 48, Budapest, Hungary, August 2016. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
5. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the Polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1990; 174(1): 250-63. Doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90073-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90073-z)
6. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012: 1003-20.
7. Ecker M., Allison S.L., Meixnar T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis virus from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 1): 179-85. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-179>
8. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2211-8. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3309-1>

Поступила 09.12.19

Принята в печать 16.02.19