



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

4

Том 67 • 2022

Volume 67 • Issue 4 • 2022

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Журнал «Вопросы вирусологии» знакомит читателей с достижениями российской и мировой вирусологии, помещает статьи, посвящённые изучению вирусов и вирусных болезней человека, животных и растений. Видное место в издании отводится публикации результатов экспериментальных работ по различным вопросам общей и частной вирусологии. В журнале печатаются материалы, способствующие внедрению в практику достижений вирусологической науки по ликвидации и снижению распространённости инфекционных заболеваний, а также их диагностике, профилактике и лечению.

В обзорных статьях обобщаются последние достижения в области вирусологии. Читатель найдет в журнале описание новых методов исследований, методических приёмов, новой аппаратуры и приспособлений.

Журнал рассчитан на вирусологов, эпидемиологов, паразитологов, фармакологов, биохимиков и других специалистов.

The Journal «Problems of virology» is focused on current advances in virology in Russia and the rest of the world. It covers research in virology and viral diseases of humans, animals, and plants. Emphasis is given to the original experimental studies on various aspects of general and special virology. The reviews of recent and historic developments in virology are regularly published.

The journal promotes the implementation of advances in virology aimed at treatment, reduction of the incidence and elimination of infectious diseases and enhancement of diagnostics, prevention, and treatment practices as well. The target audience of the journal are virologists (including medical and veterinary virologists, scientists and practitioners), epidemiologists, parasitologists, pharmacologists, biochemists and specialists in related medical disciplines.

Журнал, входит в рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» (в соответствии с п.5 Правил формирования Перечня (Приказ Минобрнауки России от 12.12.2016 N 1586), как входящий в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus) по специальностям:

1.5.10 Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2 Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22 Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские и биологические науки)

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, 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 платформе Web of Science)

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.
Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Статьи иностранных авторов и отдельные статьи, рекомендованные Редакционной коллегией журнала, публикуются на русском и английском языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
<https://www.ebsco.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: publisher@crie.ru

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Выпускающий редактор:
Архипова Елена Михайловна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.elpub.ru>).

Направляя статью в редакцию,
авторы принимают условия договора
публичной оферты
(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Подписано в печать 31.08.2022.
Формат 60×90^{1/8}.
Тираж 50 экз.
Отпечатано в типографии
«Буки Веди», www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2022

Учредители: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

4

Том 67 · 2022

Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф.,
член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н., член-корр. РАН)

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

Члены редколлегии:

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)

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

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)

Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

Борисевич С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Сергиев Посад, Россия)

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

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, 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. (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)

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

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

Макаров В.В. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

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

Манапова Э.Р. (д.м.н.; Казань, Россия)

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

Негёсов С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

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

Панин А.Н. (д.в.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

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

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

Романенко В.В. (д.м.н.; Екатеринбург, Россия)

Савельев С.И. (д.м.н., проф.; Липецк, Россия)

Сметанина С.В. (к.м.н.; Москва, Россия)

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

Чумаков П.М. (д.б.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)

Яшкульов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

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

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

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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)

Titov L.P. (MD, PhD, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member Minsk, Republic of Belarus)

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, 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 (on the Web of Science platform),

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology,
111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79.
E-mail: publisher@crie.ru

Head of the Editorial and Publishing Department: *Olga V. Osokina*

EDITORIAL OFFICE:

111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79
E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Head of Editorial Office:

Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.elpub.ru;>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement ([https://www.virusjour.elpub.ru](https://www.virusjour.elpub.ru;)).

Signed to the press on August 30, 2022.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com
© Central Research Institute for Epidemiology, 2022

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIROLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

4

Volume 67 · 2022

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,
Professor, Dr. Sci. (Medicine)**

Assistant editor in chief: **Grebennikova T.V.**, RAS Corr. Member,
Professor, Dr. Sci. (Biology)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.**, RAS Corr. Member, Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, RAS Corr. Member, Professor,
Dr. Sci. (Biology)

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Moscow, Russia)

Aliper T.I. – Professor, Dr. Sci. (Biology), (Moscow, Russia)

Antonov V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. – Professor, Dr. Sci. (Chemistry), (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. – Dr. Sci. (Biology) (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. – Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Kuzin A.A. – Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. – Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

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

Romanenko V.V. – Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Vladivostok, Russia)

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

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

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

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

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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)

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Соломай Т.В., Семенов Т.А.

Эпштейна–Барр вирусная инфекция – глобальная эпидемиологическая проблема 265

**Пашков Е.А., Пак А.В., Пашков Е.П., Быков А.С., Буданова Е.В., Поддубиков А.В.,
Свитич О.А., Зверев В.В.**

Перспектива применения препаратов на основе явления РНК-интерференции против ВИЧ-инфекции . . . 278

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Шевченко И.В., Елсукова А.А., Аронова Е.В., Власова Н.Н.

Альтернативные подходы к диагностике африканской чумы свиней на территории
Российской Федерации в 2017–2021 гг. 290

Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Усембай А.К., Булатов Е.А.

Определение оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины вируса оспы коз
(Poxviridae: Chordopoxvirinae: Capripoxvirus) против узелкового дерматита 304

**Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э.,
Чурина М.А., Виролайн П.А., Тололян Арег А.**

Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 в Калининградской области* 310

**Сайфуллин М.А., Зверева Н.Н., Карань Л.С., Григорьева Я.Е., Акиншина Ю.А., Ларичев В.Ф.,
Шамшева О.В., Базарова М.В., Сметанина С.В.**

Сравнительная характеристика завозных случаев классической и геморрагической форм
лихорадки денге в 2009–2019 гг.* 322

Лобанова В.А., Царькова К.Н., Богомолова О.А., Матвеева И.Н., Клюкина В.И.

Тест-система на основе конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу
бешенства животных (Rhabdoviridae: Lyssavirus) 331

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

**Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А.,
Терновой В.А., Локтев В.Б.**

Разработка способа выявления специфических антител к белку Е вируса жёлтой лихорадки
(Flaviviridae: Flavivirus) методом иммуноферментного анализа 341

CONTENTS

REVIEWS

Solomay T.V., Semenenko T.A.

Epstein–Barr viral infection is a global epidemiological problem. 265

Pashkov E.A., Pak A.V., Pashkov E.P., Bykov A.S., Budanova E.V., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V.

The prospects for the use of drugs based on the phenomenon of RNA interference against HIV infection 278

ORIGINAL RESEARCHES

Shotin A.R., Mazloum A., Igolkin A.S., Shevchenko I.V., Elsukova A.A., Aronova E.V., Vlasova N.N.

Alternative approaches to the diagnosis of African swine fever in the Russian Federation in 2017–2021 290

Abitaev R.T., Kondibaeva Zh.B., Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Ussembay A.K., Bulatov Ye.A.Determination of the optimal immunizing dose of heterologous goat pox virus vaccine (Poxviridae: *Chordopoxvirinae*: *Capripoxvirus*) against lumpy skin disease 304**Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Churina M.A., Virolainen P.A., Totolian Areg A.**

Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region* 310

Sayfullin M.A., Zvereva N.N., Karan L.S., Grigoreva Ya.E., Akinshina Yu.A., Larichev V.F., Shamsheva O.V., Bazarova M.V., Smetanina S.V.

Characteristics of imported cases of Dengue fever and hemorrhagic Dengue fever in 2009–2019* 322

Lobanova V.A., Tsarkova K.N., Bogomolova O.A., Matveeva I.N., Klyukina V.I.Competitive ELISA test system for the detection of antibodies to the rabies virus in animals (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*) 331

TO HELP THE VIROLOGIST

Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B.Development of a method for detection of specific antibodies to protein E yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immune assay method 341

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-122>

© СОЛОМАЙ Т.В., СЕМЕНЕНКО Т.А., 2022



Эпштейна–Барр вирусная инфекция – глобальная эпидемиологическая проблема

Соломай Т.В.^{1,2}, Семенов Т.А.^{3,4}

¹Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, 123182, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Число исследований, посвящённых Эпштейна–Барр вирусной инфекции (ВЭБ-инфекция), в последние годы растёт. Однако все они касаются клинических аспектов данной проблемы. Вопросы эпидемиологии остаются практически не изученными. Обзор отечественных и иностранных публикаций показал, что на современном этапе имеется высокая интенсивность эпидемического процесса ВЭБ-инфекции как в России, так и за рубежом. Основными показателями эпидемиологического неблагополучия являются убиквитарное распространение возбудителя и рост заболеваемости инфекционным мононуклеозом на протяжении последних лет. На ухудшение эпидемической ситуации по ВЭБ-инфекции оказывает влияние изменение иммунологической реактивности различных групп населения за счёт распространения ВИЧ, вирусов гепатита В и С, возбудителя туберкулёза и SARS-CoV-2. Вышеизложенное позволяет отнести проблему к числу глобальных и определяет необходимость оперативного внедрения системы эпидемиологического надзора за ВЭБ-инфекцией и оптимизации комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий. Снижение бремени ВЭБ возможно только при консолидированном участии специалистов разного профиля.

Ключевые слова: Эпштейна–Барр вирусная инфекция; эпидемиология; превалентность; заболеваемость; микст-инфекция; обзор

Для цитирования: Соломай Т.В., Семенов Т.А. Эпштейна–Барр вирусная инфекция – глобальная эпидемиологическая проблема. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(4): 265-277. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-122>

Для корреспонденции: Соломай Татьяна Валерьевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия. E-mail: solomay@rambler.ru

Участие авторов: Соломай Т.В., Семенов Т.А. – концепция и дизайн исследования, сбор, анализ и обобщение данных, подготовка и написание текста; Семенов Т.А. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.06.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-122>

Epstein–Barr viral infection is a global epidemiological problem

Tatyana V. Solomay^{1,2}, Tatyana A. Semenenko^{3,4}¹Interregional Department No. 1 of the FMBA of Russia, 123182, Moscow, Russia;²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums of the Ministry of Education and Science of Russia, 105064, Moscow, Russia;³National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 119048, Moscow, Russia

The number of studies devoted to Epstein–Barr viral infection (EBV infection) has been growing in recent years. However, they all relate to the clinical aspects of this problem. Epidemiology issues remain practically unexplored. A review of domestic and foreign publications has shown that at the present stage there is a high intensity of the epidemic process of EBV infection both in Russia and abroad. The main indicators of unfavorable epidemiological situation are the ubiquitous spread of the pathogen and the increase in the incidence of infectious mononucleosis in recent years. The deterioration of the epidemic situation of EBV infection is influenced by changes in the immunological reactivity of various population groups due to the spread of HIV, HBV, HCV, the causative agent of tuberculosis and SARS-CoV-2. The above makes it possible to classify the problem as a global one and determines the need for the rapid implementation of the system of epidemiological surveillance of EBV infection and optimization of the complex of preventive and anti-epidemic measures. Reducing the burden of EBV is possible only with the consolidated participation of specialists of various profiles.

Keywords: Epstein–Barr viral infection; epidemiology; prevalence; morbidity; mixed infection; review

For citation: Solomay T.V., Semenenko T.A. Epstein–Barr viral infection is a global epidemiological problem. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 265–277 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-122>

For correspondence: Tatyana V. Solomay, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, 105064, Moscow, Russia. E-mail: solomay@rambler.ru

Information about the authors:Solomay T.V., <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>Semenenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Contribution: Solomay T.V., Semenenko T.A. – concept and design of the study, collection, analysis and generalization of data, preparation of the text; Semenenko T.A. – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Received 21 June 2022
Accepted 11 August 2022
Published 31 August 2022

Введение

Эпштейн–Барр вирусная инфекция (ВЭБ-инфекция) является одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. Большая медицинская и социальная значимость обусловлена её повсеместным широким распространением, пожизненной персистенцией возбудителя в организме хозяина, стойкими иммунологическими изменениями в периоды активного инфекционного процесса, участием в развитии соматической, в том числе онкологической, патологии, отсутствием эффективных средств профилактики и лечения [1]. По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации»¹, экономический ущерб только

от инфекционного мононуклеоза (ИМ) (без учёта ассоциированных с ВЭБ заболеваний) в 2020 г. составил более 2,3 млрд руб.

Высокая инфицированность населения ВЭБ во многом связана с наличием разнообразных путей передачи возбудителя: воздушно-капельного, контактно-бытового, полового и парентерального [2]. Описано ante- и интранатальное инфицирование ВЭБ, которое, в зависимости от гестационного срока, может приводить к преждевременному прерыванию беременности, формированию пороков развития и врождённой инфекции [3]. В настоящее время в соответствии с приоритетом государственной политики по увеличению рождаемости и укреплению здоровья детей и подростков придаётся особое значение вер-

¹О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с.

тикальному пути передачи вируса в связи с высоким уровнем перинатальных потерь и отсутствием чётких критериев по ведению беременности, отягощенной ВЭБ-инфекцией [4].

Для инфекционного процесса, вызванного ВЭБ, характерно многообразие клинических форм, однако единой классификации не существует. Клинически выраженная первичная острая ВЭБ-инфекция в детском возрасте протекает в виде ИМ. Продолжительность периода болезни может достигать нескольких месяцев и характеризоваться длительной и стойкой астенизацией и изменением иммунологической реактивности с присоединением вторичных инфекций [5]. Всё это приводит к формированию когорты часто и длительно болеющих детей [6] и косвенно влияет на эффективность дошкольного и школьного образования. В последние годы наблюдается тенденция к эпидемиологическому неблагополучию по заболеваемости ИМ у лиц 15 лет и старше [7].

Персистенция возбудителя в организме существенно расширила спектр ассоциированных с ВЭБ заболеваний, которые не ограничиваются проявлениями реактивации инфекционного процесса. В научных публикациях приводятся данные о триггерной роли вируса в развитии аутоиммунных заболеваний, среди которых классические ревматические болезни, васкулиты и др. [8], хроническое поражение почек [9], патология сердечно-сосудистой системы [10], желудочно-кишечного тракта [11]. Отдельную проблему представляют ассоциированные с ВЭБ злокачественные новообразования лимфоидного и эпителиального генеза (лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома и др.). Перечисленные состояния являются основной причиной инвалидизации населения и преждевременной смертности как в нашей стране, так и во всём мире [12].

Анализ данных отечественной и зарубежной научной литературы свидетельствует о росте числа исследований, посвящённых изучению отдельных аспектов ВЭБ-инфекции. При этом преобладающее большинство публикаций имеет клиническую и иммунологическую направленность. Работы, касающиеся системного изучения эпидемиологических особенностей инфекции, практически отсутствуют, в связи с чем возникает необходимость установить значимость и определить вирусологические и эпидемиологические характеристики ВЭБ-инфекции на современном этапе, что представляется актуальным в условиях напряжённой эпидемической ситуации в стране и мире.

Структура и генетическое разнообразие вируса Эпштейна–Барр

ВЭБ является представителем семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Gammaherpesvirinae*, рода *Lymphocryptovirus*, вирус герпеса человека 4-го типа (ВГЧ-4).

В структуре вириона ВЭБ выделяют икосаэдрический нуклеокапсид, окружённый тегументом и покрытый внешней оболочкой. Оболочка, формирующаяся на этапе выхода ВЭБ из клетки, содержит липопро-

теины хозяина и специфические гликопротеины вируса, наиболее изученными из которых являются gp350, gp42, gH, gL и gB. Среди всех изученных поверхностных гликопротеинов ВЭБ только gp350 и gp42 являются уникальными для данного возбудителя, остальные присутствуют и у других представителей семейства *Herpesviridae* [13].

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) ВЭБ кодирует более 85 генов, которые определяют синтез белков латентной и литической фаз жизненного цикла. Сложности проведения полногеномного секвенирования не позволили до настоящего времени сформировать единой классификации возбудителя. Используемые варианты классификации ВЭБ основаны на изучении последовательностей отдельных генов вируса.

Традиционно выделяют два основных генотипа – А и В, существенно различающиеся между собой по гену *EBNA2* (идентичность составляет 51%) и сопряжённому с ним *EBNA3* (идентичность 71%). Тип А является преобладающим и распространён в Европе, Азии, Северной и Южной Америке. Тип В чаще встречается на Аляске, в Папуа – Новой Гвинее и Центральной Африке (преимущественно в Кении). Также имеет место инфицирование одновременно двумя типами вируса [14].

Помимо этого, описаны варианты ВЭБ по гену *LMP1*, кодирующему одноимённый белок: В95-8; Аляска (Ala), Китай (Ch1 и Ch2), Средиземноморье (Med+ и Med–), Северная Каролина (NC), Юго-Восточная Азия 1 и 2 (SEA1 и SEA2), Argentina, LMP-1-TatK (у этнических татар Поволжья). Указанные геноварианты, за исключением В95-8, относительно которого происходило ранжирование, названы по месту их обнаружения, однако встречаются и в других регионах и не имеют чёткой привязки к местности. Изучению вариантов *LMP1* посвящено наибольшее число работ, что можно объяснить его участием в ВЭБ-ассоциированном канцерогенезе [15].

В других работах описывается разнообразие генов *EBNA-1* и *BZLF1*. Долгое время интерес к *EBNA1* был обусловлен тем, что он обеспечивает жизнедеятельность вируса в латентной фазе и кодирует единственный белок ВЭБ, воспроизводимый в ассоциированных с вирусом опухолях [16]. Однако результаты исследования, опубликованные в 2018 г., показали, что, помимо *EBNA1*, участие в канцерогенезе принимают и литические гены [17]. Тем не менее учёными было описано несколько филогенетических вариантов *EBNA1*, которые в настоящий момент никак не соотношены с наличием патологических состояний и географическим распространением [15].

Незначительное число исследований посвящено изучению варибельности гена *BZLF1*, играющего ключевую роль в модуляции перехода от состояния латентности к литической репродукции вируса. Выделено несколько геновариантов в зависимости от профиля области Zp, из которых наибольшее распространение получили V1 и V3. Распределение *BZLF1* на V1 и V3 отражает его близость к локусу

EBNA3, который, наряду с *EBNA2*, определяет наличие двух основных типов ВЭБ (А и В) [14].

Взаимосвязь с основными типами ВЭБ описана и для N-концевого фрагмента гена *BLLF1*, кодирующего гликопротеин gp350 [14]. Исследование вариаций gp350 относительно ВЭБ-ассоциированных опухолей не выявило каких-либо особенностей по сравнению со здоровыми донорами крови, но также показало связь последовательности N-концевого фрагмента с вариантами гена *EBNA3* [18]. Интересным представляется тот факт, что с момента развития первичной острой инфекции до её разрешения у одного индивидуума последовательность gp350 претерпевала изменения. При этом сайт связывания с В-клетками оставался стабильным. Количественные характеристики выявленных мутаций, делеций и инсерций положительно коррелировали с высокой вирусной нагрузкой [19].

Неоднократно предпринимались попытки установить связь изменчивости отдельных генов ВЭБ с развитием патологических состояний, а также с географическим распространением в популяции здоровых лиц, которые в настоящий момент не дали однозначных результатов [20]. Совершенствование технологий полногеномного секвенирования позволило провести системный анализ последовательностей всех генов ВЭБ и выделить, помимо двух основных клад (А и В), несколько субклад. Так, в пределах клады А были обнаружены азиатская и космополитическая (включает смешанные последовательности из Европы, Австралии и Америки с некоторыми последовательностями из Аргентины, а также поддерживаемую внутреннюю группу африканских последовательностей) субклады [21]. В Российской Федерации исследования были сконцентрированы на изучении последовательностей *LMP1* и их вероятной связи с онкогенезом [22]. Вариабельность других генов ВЭБ не анализировалась, полногеномное секвенирование не проводилось, в связи с чем в нашей стране имеется недостаток сведений о циркулирующих возбудителях. В то же время исследования в этой области могут способствовать решению важных задач по разработке средств специфической профилактики, терапии и диагностики.

Патогенез

Проникновение ВЭБ в организм хозяина происходит через слизистую верхних дыхательных путей. В дальнейшем вирус достигает регионарных лимфоузлов, откуда попадает в кровотоки. При внутриутробном инфицировании, минуя плаценту, возбудитель сразу попадает в кровяное русло плода. Виремия сопровождается диссеминацией ВЭБ, в том числе при участии В-лимфоцитов периферической крови. В результате патоген проникает в органы и ткани, содержащие клетки-мишени (селезёнка, печень, желудочно-кишечный тракт, сердце, почки и др.). В литературе описана тропность ВЭБ к эпителиальным, дендритным, В-, Т- и НК-клеткам, клеткам гладкой мускулатуры [23, 24].

Эффективное проникновение патогена в клетку требует участия поверхностных гликопротеинов – gp350,

gp42, gH/ gL и gB, однако до конца этот процесс не изучен. В клетках-мишенях происходит размножение возбудителя, выход потомства которого сопровождается нарушением функции задействованных органов и систем [25, 26].

Способность ВЭБ уклоняться от иммунного ответа хозяина не позволяет полностью избавиться от вируса. Острая инфекция переходит в хроническую, в течении которой выделяют две фазы – латентную и реактивацию. Во время латентной хронической инфекции вирусное потомство не воспроизводится, а генетический материал ВЭБ находится в ядре клетки хозяина в виде кольцевой эписомы. Воздействие факторов, снижающих иммунный контроль, приводит к переключению фаз жизненного цикла вируса [27].

Одним из основных компонентов патогенеза ВЭБ-инфекции является формирование иммунодефицита. При встрече с патогеном в организме человека происходит стимуляция врождённого иммунного ответа путём активации Toll-подобных рецепторов (TLRs). Для уклонения от врождённого иммунитета хозяина ВЭБ способен дифференцированно подавлять передачу сигналов TLRs с помощью собственных белков, в зависимости от фазы жизненного цикла [28]. Установлено, что в результате первичной острой ВЭБ-инфекции происходят изменения в клеточном звене специфического (приобретённого) иммунитета за счёт увеличения числа CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток и снижения В-клеток с фенотипами CD19⁺, CD21⁺, CD81⁺; CD19⁺, CD21⁻, CD81⁺; CD19⁺, CD21⁺, CD81⁻ [29]. Снижение популяции В-клеток под воздействием ВЭБ приводит к недостаточной выработке Ig, которые не способны своевременно эффективно нейтрализовать патоген [30].

Лабораторная диагностика

Для диагностики ВЭБ-инфекции используются общеклинические лабораторные показатели, результаты биохимических, иммунологических и молекулярно-биологических исследований. Для активной ВЭБ-инфекции характерны изменение количества лейкоцитов, эритроцитов, моноцитов, лимфоцитов, гемоглобина в крови, повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и уровня С-реактивного белка (СРБ), превышение референсных значений аланин-аминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), билирубина, обнаружение протеинов в общем анализе мочи [31]. Нарушения клеточного звена иммунитета проявляются изменением соотношения CD8⁺/CD4⁺. Кроме того, отмечается снижение уровней интерферонов α и γ [32]. В перечень неспецифических маркеров также целесообразно включить определение уровней неоптерина и мелатонина. При вирусных инфекциях концентрация неоптерина в крови повышается задолго до виремии и обнаружения специфических антител к патогену, что позволяет эффективно использовать данный маркер для раннего выявления источников инфекции, в том числе среди доноров крови, органов и тканей. Концентрация мелатонина в крови при ре-

активации хронической ВЭБ-инфекции повышается постепенно и достигает максимума на 15–28-й день от начала репродукции ВЭБ [33].

К специфическим методам лабораторной диагностики относят выявление возбудителя (обнаружение генетического материала молекулярно-биологическими методами и антигенов иммунологическими методами) и антител к его белкам – капсидному (IgM VCA, IgG VCA), раннему (IgG EA) и нуклеарному (IgG EBNA) антигенам (**таблица**). Однако результаты таких исследований не дают информации о наличии у индивидуума вируснейтрализующих антител, например, к гликопротеину gp350. Отсутствие эффективных методов определения вируснейтрализующих антител на современном этапе не позволяет учёным дать исчерпывающую характеристику состояния гуморального иммунитета при ВЭБ-инфекции [34].

Если в клинической практике результаты лабораторных исследований необходимы в первую очередь для определения фазы заболевания (первичная острая, хроническая латентная ВЭБ-инфекция, её реактивация) и для оценки иммунного статуса пациента для его последующей коррекции, то комплексное использование различных методов позволяет решить ряд эпидемиологических задач:

- выявить источники инфекции и восприимчивый контингент [35];
- дать характеристику распространённости ВЭБ в популяции [36];
- оценить уровни и динамику заболеваемости активной ВЭБ-инфекцией [37–39];
- изучить иммунный статус на популяционном уровне для перспективной разработки новых средств и методов специфической и неспецифической профилактики и лечения ВЭБ-инфекции [29];

– оценить результаты исследования эффективности лекарственных и профилактических препаратов у пациентов с ВЭБ-инфекцией [34] и др.

Превалентность

ВЭБ признан одним из самых распространённых в человеческой популяции патогенов. По результатам проведённых исследований, превалентность маркеров хронической ВЭБ-инфекции (IgG VCA и IgG EBNA) среди взрослого населения достигает 90–100% [36], что сопоставимо только с распространённостью возбудителя ветряной оспы – около 95% [40]. Для сравнения: частота выявления IgG к вирусу простого герпеса 1-го типа (ВПГ1) в указанной возрастной группе составляет 66,6%, 2-го типа (ВПГ2) – 13,2% [41], цитомегаловирусу (ЦМВ) – 45% [42].

Результаты зарубежных исследований свидетельствуют о прямой связи превалентности маркеров хронической ВЭБ-инфекции с возрастом обследуемых. Так, частота выявления IgG VCA в популяции здоровых детей из Северного и Южного Китая растёт с 48,6 и 39,5% у детей до 1 года до 90,3 и 91,9% к 8–9 годам соответственно [43]. В Тегеране у лиц до 3 лет данный показатель достигает 50%, у взрослых 20–29 лет – 92,1%, 30–39 лет – 92,5%, старше 40 лет – 94,8% [44]. В Катаре при обследовании 673 доноров крови в возрасте 20 лет и старше было установлено, что превалентность по IgG VCA в возрастной группе 20–30 лет равнялась 96,0%, 31–40 лет – 97,3%, 41–50 лет – 100%, старше 50 лет – 100% [45]. В Варшаве при исследовании сывороток крови 90 медицинских сестер в возрасте 24–65 лет IgG VCA были обнаружены у 100% обследованных [46]. В Азербайджане из 500 здоровых лиц в возрасте от 49 до 75 лет IgG VCA имели 85,2% [47].

Таблица. Специфические методы лабораторной диагностики Эпштейна–Барр вирусной инфекции и интерпретация их результатов
Table. Specific methods of laboratory diagnostics of EBV infection and interpretation of its results

Фаза инфекции Infection phase	ДНК (или антиген) ВЭБ в крови EBV DNA (or antigen) in the blood	IgM VCA	IgG VCA	IgG EA	IgG EBNA
Отсутствие инфицирования Absence of infection	–	–	–	–	–
Инкубационный период Incubation period	±	–	–	–	–
Очень ранняя первичная инфекция Very early primary infection	+	+	–	–	–
Ранняя первичная инфекция Early primary infection	+	+	+	+	–
Поздняя первичная инфекция Late primary infection	±	±	+	+	±
Паст-инфекция Past infection	–	–	+	±	+
Хроническая инфекция, латентное течение Chronic infection, latent course	–	–	+	–	±
Хроническая инфекция, реактивация Chronic infection, reactivation	±	±	+	+	+

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр.

Note. EBV – Epstein–Barr virus.

В Российской Федерации в разные годы на маркеры ВЭБ-инфекции обследовались небольшие группы лиц, различающиеся по полу и возрасту. Так, из 137 воспитанников детских домов 3–16 лет IgG VCA выявлены у 123 человек (89,8%), в том числе в возрастной группе 3–6 лет этот показатель составил 87,5%, 7–10 лет – 87,3%, 11–16 лет – 93,1% [48]. У женщин в возрасте до 30 лет превалентность по IgG VCA равнялась 85,6%, старше 30 лет – 96,4% [49].

Наиболее масштабные исследования были проведены Санкт-Петербургским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в 2006–2012 гг. Из обследованных 2322 человек в возрасте от 0 до 65 лет IgG EBNA были обнаружены у 37,6% детей до 1 года, 39,5% – 1–7 лет, 47,3% – 8–12 лет, 61,7% – 13–17 лет. При этом в группе лиц старше 18 лет данный маркер идентифицирован только у 41,8% обследованных, что указывает на снижение показателя серопревалентности у взрослых и не соотносится с данными зарубежных исследований. Авторы объясняют полученные результаты более интенсивным течением эпидемического процесса у молодого поколения на момент проведения исследования, чем 30–50 лет назад [50]. С другой стороны, снижение превалентности в старшей возрастной группе российских граждан может быть обусловлено различиями в выбранных маркерах (IgG EBNA, по сравнению с IgG VCA) и использованных наборов реагентов. Отсутствие других исследований, сопоставимых с данным, не позволяет однозначно говорить об истинных уровнях распространённости ВЭБ в нашей стране и её снижении во взрослой популяции и требует дальнейшего детального изучения проблемы. Кроме того, с момента проведения описанного исследования прошло более десяти лет, на протяжении которых интенсивность эпидемического процесса ВЭБ-инфекции в нашей стране могла существенно измениться.

Подтверждением высказанных предположений стали результаты метаанализа распространённости ВЭБ в странах Европы и Азии в 2000–2019 гг. [51], в ходе которого были установлены:

- самые низкие показатели отмечены среди детей до 1 года и 1–2 лет (53,3 и 50,9%) с последующим ростом по мере увеличения возраста обследованных и повышением 90% в возрастных группах 18–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60 лет и старше.

- суммарная превалентность ВЭБ в странах Азии (86,7%) достоверно преобладала над таковой в Европе (76,3%), $p < 0,05$;

- показатели превалентности среди совокупного населения стран Европы и Азии выросли с 68,9% в 2000–2012 гг. до 89,6% в 2013–2019 гг., $p < 0,05$.

Заболееваемость

Выявленные особенности указывают не только на широкое распространение возбудителя в популяции человека, но и на высокую интенсивность эпидемического процесса ВЭБ-инфекции на современном этапе, которая может быть оценена в том числе при

помощи показателя заболеваемости. Однако практически во всех государствах имеются трудности в организации регистрации и достоверного учёта случаев первичной острой ВЭБ-инфекции. В ряде стран, в том числе в Российской Федерации, учёту подлежит ИМ, основным возбудителем которого является ВЭБ. В то же время описаны единичные случаи развития сходных клинических проявлений при цитомегаловирусной инфекции, а также при инфекции, вызванной ВГЧ-6. Это обстоятельство не позволяет однозначно отождествлять ИМ и первичную ВЭБ-инфекцию. Кроме того, клиника ИМ характерна не только для первичной, но и для реактивации хронической ВЭБ-инфекции [52, 53], а результаты лабораторных исследований указывают на наличие стёртого и бессимптомного течения активного инфекционного процесса [54]. В ряде стран официальная регистрация и статистический учёт случаев ИМ не осуществляются совсем [47]. Это затрудняет оценку заболеваемости первичной острой ВЭБ-инфекцией.

Тем не менее немногочисленные данные научной литературы свидетельствуют о росте частоты регистрации ИМ на протяжении последних лет. Так, в Великобритании число лиц, госпитализированных в стационары по поводу ИМ в 2002–2013 гг., существенно увеличилось [55]. На Украине с 1997 по 2013 г. отмечен продолжительный интенсивный подъём заболеваемости [56]. В публикациях отечественных авторов приводятся данные, характеризующие заболеваемость как в отдельных субъектах, так и в стране в целом. Рост показателей в 2006–2015 гг. отмечен в Пермском крае [38], в 2006–2017 гг. – в Иркутской области [39], в 2000–2006 и 2010–2016 гг. – в Набережных Челнах [57], в 2009–2013 гг. – в Архангельской области [58], в 2000–2016 гг. – в Российской Федерации в целом [37].

Микст-инфекции

В качестве вероятных причин ухудшения эпидемической обстановки по ВЭБ-инфекции называются повышение доступности средств и методов лабораторной диагностики [52], а также распространение других патогенов, изменяющих иммунологический статус популяции, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусы гепатита В, С (ВГВ, ВГС), туберкулёз, COVID-19 [39].

Косвенным доказательством оппортунистической роли ВЭБ является рост показателей заболеваемости ИМ в Иркутской области на фоне эпидемии ВИЧ-инфекции [39]. Было показано, что ИМ является наиболее частым проявлением реактивации ВЭБ-инфекции у ВИЧ-позитивных лиц. Реже развиваются ВЭБ-ассоциированная интерстициальная пневмония, лейкоплакия языка, назофарингеальная карцинома и неходжкинская лимфома, включая лимфому Беркитта [59]. Так, клинические наблюдения за ВИЧ-позитивными украинскими пациентами с неходжкинскими лимфомами позволили заподозрить у них активную ВЭБ-инфекцию, что в последующем было подтверждено выявлением ДНК вируса в крови [60]. В Бразилии при обследовании 94 ВИЧ-инфицированных пациентов

ДНК ВЭБ в слюне идентифицирована в 100% случаев. При этом у 20 из включённых в исследование пациентов имелись проявления оральной лейкоплакии. Концентрация генетического материала ВЭБ в слюне ВИЧ-инфицированных с оральной лейкоплакией была значимо выше, чем без неё [61]. Аналогичные данные были получены в Индонезии [62]. Отдельный интерес представляют результаты исследования, проведённого американскими учёными, в ходе которого установлено влияние высокой концентрации ДНК ВЭБ в клетках периферической крови ВИЧ-позитивных пациентов на увеличение молекулярного разнообразия рибонуклеиновой кислоты (РНК) ВИЧ [63]. Можно предположить, что ВЭБ играет определённую роль в эволюции ВИЧ, что, в свою очередь, приведёт к ухудшению эпидемической ситуации и потребует разработки новых подходов профилактики.

Результатов популяционных исследований, посвящённых коинфекции ВЭБ и ВГВ/ВГС в доступной отечественной и зарубежной литературе не обнаружено. Описаны единичные клинические случаи реактивации ВЭБ на фоне гепатита В [64]. Известно, что как ВЭБ, так и ВГВ и ВГС способны вызывать лимфопролиферативные процессы [65]. Кроме того, указанные возбудители обладают тропностью к гепатоцитам, что может определять как сочетанное, так и антагонистическое действие при одновременной персистенции в организме хозяина [66, 67]. Так, при обследовании 259 больных вирусными гепатитами А, В, С, D и гепатитом неуточнённой этиологии генетический материал вирусов герпеса обнаружен в 12% случаев. В структуре выявленных возбудителей превалировал ВЭБ (58,1%). Клиническое течение гепатита у лиц с сопутствующей ВЭБ-инфекцией расценивалось как более тяжёлое. У них достоверно чаще диагностировался цирроз печени [68]. При этом поражения печени, вызванные ВЭБ, у иммунокомпетентных пациентов характеризуются, как правило, лёгким и бессимптомным течением [69]. Тем не менее данная проблема остаётся малоизученной и открывает перспективы для дальнейших исследований.

Ещё одной инфекцией, связанной с существенной иммунологической перестройкой организма, является туберкулёз. Несмотря на некоторое снижение заболеваемости туберкулёзом, в Российской Федерации, её показатели остаются на высоком уровне [70] и почти вдвое превышают таковые в европейских странах [71]. Вероятно, по этой причине за рубежом исследованиям ВЭБ-инфекции в сочетании с туберкулёзом не уделяется должного внимания. Однако и в нашей стране данной проблеме посвящены только единичные публикации. Так, при обследовании 60 детей в возрасте от 6 мес до 6 лет с локальными формами первичного туберкулёза и туберкулёзной интоксикацией частота выявления генетического материала ВЭБ в пуле мононуклеарных клеток крови составила 35,3%. Ещё в 12% установлено сочетание ВЭБ и ВГЧ-6 [72]. В Москве у больных туберкулёзом описаны поражения центральной нервной системы, ассоциированные с ВЭБ [73]. В Омске в ходе клини-

ческого наблюдения за 381 пациентом с сочетанной патологией туберкулёза и ВИЧ-инфекции показано, что неблагоприятный исход лечения был сопряжён с наличием активной ВЭБ-инфекции [74].

Исследуемая патология рассматривается в качестве одной из основных причин летальных исходов пациентов не только с туберкулёзом, но и с иными инфекциями. В литературе описаны случаи смерти больных гриппом, находившихся на искусственной вентиляции лёгких, после реактивации ВЭБ-инфекции [75]. Однако особое внимание необходимо уделить сочетанию ВЭБ и COVID-19.

Первые описания единичных случаев выявления маркеров активной ВЭБ-инфекции у пациентов с COVID-19 датированы 2020 г. [76]. Результаты более детальных исследований опубликованы в 2021 г. Так, влияние реактивации ВЭБ на тяжесть течения COVID-19 впервые было проиллюстрировано российскими учёными в ходе исследования, проведённого весной 2020 г. (опубликовано в феврале 2021). Маркеры активной ВЭБ-инфекции выявлены у 80% больных COVID-19. При этом моноинфекция, вызванная SARS-CoV-2, протекала преимущественно в лёгкой форме, а тяжесть клинических проявлений, выражавшуюся в развитии интерстициальной пневмонии, определяло сочетанное течение SARS-CoV-2 и ВЭБ-инфекции. Реактивация ВЭБ на фоне COVID-19 развивалась у лиц, имевших низкие уровни IgG VCA и IgG EBNA [77].

Подтверждением высокой частоты реактивации ВЭБ-инфекции при COVID-19 стала работа итальянских исследователей, опубликованная в марте 2021 г., в которой из 103 пациентов, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии, ДНК ВЭБ в крови была выявлена у 91 (88,3%) [77]. В июне 2021 г. в работе учёных из Турции и США показано, что у 66,7% пациентов с long-COVID также лабораторно подтверждена реактивация ВЭБ, свидетельствующая о том, что многие длительные симптомы не являются прямым действием вируса SARS-CoV-2 [78]. В апреле 2022 г. опубликованы результаты исследования, проведённого в г. Ухань (Китай), где показано, что из 217 пациентов с COVID-19 (30 умерли и 187 выписаны живыми) реактивация ВЭБ была выявлена только у 55 человек (25,3%). При этом значимо более высокая концентрация IgG EA имела место в крови умерших, по сравнению с выжившими [79].

Приведённые результаты свидетельствуют в первую очередь о параллельном развитии одновременно двух пандемий – COVID-19 и ВЭБ-инфекции, из которых вторая является более весомой по причине обусловленных ею медико-социальных и экономических потерь. Однако именно ей уделяется незаслуженно мало внимания.

Профилактика ВЭБ-инфекции

Несмотря на сложную эпидемическую обстановку по ВЭБ-инфекции, в данный момент в мире отсутствует система мер эффективной профилактики, охватывающая все звенья эпидемического процесса.

Описанные сложности диагностики, регистрации и учёта случаев заболеваний, наряду с длительностью и многогранностью клинических проявлений, отсутствием эффективных терапевтических стратегий, не позволяют своевременно выявлять, изолировать и лечить больных с активной ВЭБ-инфекцией [80]. В настоящее время ведётся активный поиск этиотропных лекарственных средств, способных подавлять репликацию ВЭБ [81, 82]. Используемые в современной клинической практике для лечения других герпесвирусных инфекций аналоги нуклеозидов не обладают надежной эффективностью в отношении данного патогена. Так, профилактический приём ацикловира или ганцикловира серонегативными к ВЭБ реципиентами трансплантата почек позволяет отсрочить, но не предотвратить развитие первичной ВЭБ-инфекции [83].

Дальнейшему распространению патогена способствует отсутствие действенных мер прерывания механизмов передачи в организованных коллективах и домашних очагах [84]. Пожизненная персистенция ВЭБ в организме хозяина с периодической сменой фаз латентного течения и реактивации обуславливает необходимость разработки мер специфической профилактики, нацеленных на защиту неинфицированного восприимчивого контингента. В зарубежных публикациях приводятся сведения о разработке кандидатных вакцин против ВЭБ, однако ни один из описанных препаратов до настоящего времени не прошёл все фазы клинических испытаний [85].

Заключение

Обзор отечественных и зарубежных публикаций показал, что на современном этапе существует высокая интенсивность эпидемического процесса ВЭБ-инфекции на территории всех государств, в которых проводились исследования. Основными показателями эпидемиологического неблагополучия являются убиквитарное распространение возбудителя в популяции человека и рост заболеваемости ИМ на протяжении последних лет. На ухудшение эпидемической ситуации по ВЭБ-инфекции оказывает влияние изменение иммунологической реактивности различных групп населения за счёт распространения ВИЧ, ВГВ, ВГС, возбудителя туберкулёза и SARS-CoV-2. Всё это позволяет отнести проблему к числу глобальных и определяет необходимость оперативного внедрения системы эпидемиологического надзора за ВЭБ-инфекцией и оптимизации комплекса профилактических и противозидемических мероприятий. Снижение бремени ВЭБ возможно только при консолидированном участии специалистов разного профиля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Бошняк Р.Е. и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и ее компонентов. *Анализ риска здоровью*. 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15>
2. Исаков В.А., ред. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Афонасьева Т.М. Значение Эпштейна–Барр вирусной инфекции в патологии беременности. Перинатальное инфицирование

плода. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2017; 19(11): 13–7. <https://doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2017-19-11-13-17>

4. Агаева М.И., Агаева З.А. Характерные особенности течения герпесвирусных инфекций во время беременности. *Клинический разбор в общей медицине*. 2022; (1): 49–55. <https://doi.org/10.47407/kr2022.3.1.00118>
5. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Тутьельян А.В., Боброва М.В. Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(6): 685–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139>
6. Грешнякова В.А., Горячева Л.Г., Никифорова А.О. Инфекционный мононуклеоз: нетипичная манифестация. *Детские инфекции*. 2022; 21(1): 62–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2022-21-1-62-65>
7. Попкова М.И., Уткин О.В. Особенности эпидемического процесса инфекционного мононуклеоза в Нижегородской области в современный период. *Здоровье населения и среда обитания*. 2021; (4): 79–86. <https://doi.org/10.35627/22195238/20213374-7986>
8. Харитоновна Л.А., Соболева Н.Г. Роль инфекционного фактора при ювенильном ревматоидном артрите у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018; 63(3): 59–63. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-59-63>
9. Бархатова Т.В., Сенягина Н.Е., Краснов В.В. Распространенность маркеров герпесвирусных инфекций при хронической патологии почек у детей. *Медицинский альманах*. 2011; (6): 196–9.
10. Руженцова Т.А., Горелов А.В. Значение острых респираторных вирусных инфекций в развитии хронической патологии сердца у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; (3): 42–6.
11. Соломай Т.В. Патология желудочно-кишечного тракта при инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Инфекционные болезни: Новости, мнения, обучение*. 2020; 9(3): 74–8. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-74-78>
12. Денисов Л.А. Федеральный проект «Укрепление общественного здоровья» как важнейшая составляющая национального проекта «Демография». *Санитарный врач*. 2021; (7): 40–55. <https://doi.org/10.33920/med-08-2107-04>
13. Cui X., Cao Z., Chen Q., Arjunaraja S., Snow A.L., Snapper C.M. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine*. 2016; 34(34): 4050–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.021>
14. Correia S., Bridges R., Wegner F., Venturini C., Palser A., Middelcorp J.M., et al. Sequence variation of Epstein-Barr virus: viral types, geography, codon usage, and diseases. *J. Virol.* 2018; 92(22): e01132–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
15. Попкова М.И., Уткин О.В. Генетическое разнообразие вируса Эпштейна–Барр: современный взгляд на проблему. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022; 99(1): 93–108. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-228>
16. Sullivan K., Isabel S., Khodai-Booran N., Paton T.A., Abdunoor M., Dipchand A.I., et al. Epstein-Barr virus latent gene EBNA-1 genetic diversity among transplant patients compared with patients with infectious mononucleosis. *Clin. Transplant.* 2019; 33(4): e13504. <https://doi.org/10.1111/ctr.13504>
17. Borozan I., Zapatka M., Frappier L., Ferretti V. Analysis of Epstein-Barr virus genomes and expression profiles in gastric adenocarcinoma. *J. Virol.* 2018; 92(2): e01239–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01239-17>
18. Luo B., Liu M., Chao Y., Wang Y., Jing Y., Sun Z. Characterization of Epstein-Barr virus gp350/220 gene variants in virus isolates from gastric carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Arch. Virol.* 2012; 157(2): 207–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1148-z>
19. Weiss E.R., Alter G., Ogembo J.G., Henderson J.L., Tabak B., Bakış Y., et al. High Epstein-Barr virus load and genomic diversity are associated with generation of gp350-specific neutralizing antibodies following acute infectious mononucleosis. *J. Virol.* 2016; 91(1): e01562–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01562-16>
20. Farrell P.J., White R.E. Do Epstein-Barr virus mutations and natural genome sequence variations contribute to disease? *Biomolecules*. 2021; 12(1): 17. <https://doi.org/10.3390/biom12010017>

21. Blazquez A.C., Berenstein A.J., Torres C., Izquierdo A., Lezama C., Moscatelli G., et al. Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein-Barr virus genomes from Argentina and other geographies. *Viruses*. 2021; 13(6): 1172. <https://doi.org/10.3390/v13061172>
22. Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Дидук С.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34(2): 71–5. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75>
23. Kerr J.R. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J. Clin. Pathol.* 2019; 72(10): 651–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>
24. Якушина С.А., Кистенева Л.Б. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4): репликативные стратегии. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 191–202. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202>
25. van Zyl D.G., Mautner J., Delecluse H.J. Progress in EBV vaccines. *Front. Oncol.* 2019; 9: 104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00104>
26. Shi T., Huang L., Chen Z., Tian J. Characteristics of primary Epstein-Barr virus infection disease spectrum and its reactivation in children, in Suzhou, China. *J. Med. Virol.* 2021; 93(8): 5048–57. <https://doi.org/10.1002/jmv.26941>
27. Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 2020; 42(2): 131–42. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
28. Jangra S., Yuen K.S., Botelho M.G., Jin D.Y. Epstein-Barr virus and innate immunity: Friends or Foes? *Microorganisms*. 2019; 7(6): 183. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060183>
29. Триско А.А., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Чудилова Г.А., Ломтагидзе Л.В. Особенности клеточного иммунитета при острой инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(4): 13–6.
30. van den Heuvel D., Jansen M.A., Bell A.I., Rickinson A.B., Jaddeo V.W., van Dongen J.J., et al. Transient reduction in IgA⁺ and IgG⁺ memory B cell numbers in young EBV-seropositive children: the Generation R Study. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101(4): 949–56. <https://doi.org/10.1189/jlb.5VMAV0616-283R>
31. Наговицына Е.Б. Современные подходы к диагностике и лечению инфекционного мононуклеоза Эпштейна–Барр-вирусной этиологии. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2016; (3): 45–50.
32. Требухов А.В., Жижелева В.Ю., Мальцева М.В., Найдюк Н.А. Особенности иммунного статуса у часто и длительно болеющих детей – жителей Алтайского края. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019; (4): 30–40. <https://doi.org/10.31549/2542-1174-2019-4-30-40>
33. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Готвянская Т.П., Коноплева М.В., Давтян С.А., Суслов А.П. и др. Роль С-реактивного белка, неоптерина и мелатонина в диагностике инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Иммунология*. 2021; 42(5): 502–10. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-502-510>
34. Mutsunguma L.Z., Rodriguez E., Escalante G.M., Muniraju M., Williams J.C., Warden C., et al. Identification of multiple potent neutralizing and non- antibodies against Epstein-Barr virus protein with potential for clinical application and as reagents for mapping immunodominant epitopes. *Virology*. 2019; 536: 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.026>
35. Sharifipour S., Davoodi Rad K. Seroprevalence of Epstein-Barr virus among children and adults in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* 2020; 34: 100641. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100641>
36. Михнева С.А., Мартынов Ю.В., Кухтевич Е.В., Гришина Ю.Ю. Инфекционный мононуклеоз: пространственно-временное проявление эпидемического процесса. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018; (10): 50–4. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-307-10-50-54>
37. Потапова Н.О., Софронова Л.В., Рысинская Т.К. Распространенность инфекционного мононуклеоза среди детей Пермского края. В кн.: *Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы педиатрии»*. Пермь: Книжный формат; 2017: 188–91.
38. Баянова Т.А., Кудрявцева Д.П., Плотникова Ю.К., Ботвинкин А.Д. Изменение заболеваемости некоторыми герпесвирусами инфекциями в популяции с высокой превалентностью ВИЧ-инфекции. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(3): 75–84. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-3-75-84>
39. Koshy E., Mengting L., Kumar H., Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of zoster: A comprehensive review. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2018; 84(3): 251–62. https://doi.org/10.4103/ijdv.IJDVL_1021_16
40. James C., Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
41. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20(4): 202–13. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
42. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099857>
43. Sharifipour S., Davoodi Rad K. Seroprevalence of Epstein-Barr virus among children and adults in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* 2020; 34: 100641. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100641>
44. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., AlMarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*. 2017; 12(12): e0189033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189033>
45. Zajac P.W., Czarkowska-Paczek B., Wyczalkowska-Tomasik A. Prevalence and molecular epidemiology of CMV and EBV among nurses working in pediatrics, transplantology, and primary health care. *J. Occup. Health*. 2020; 62(1): e12112. <https://doi.org/10.1002/1348-9585.12112>
46. Ахмедов Ю.А., Мамедов М.К., Джавадзаде С.Н., Солтанов А.А., Магамедли А.Ю. Серопозитивность в отношении вируса Эпштейна–Барр среди онкологических больных и здоровых лиц, живущих в Азербайджане. *Биомедицина (Баку)*. 2018; (2): 6–9.
47. Краснов В.В., Позднякова М.А., Кулова Е.А., Обрядина А.П., Астраханцева И.В. Состояние иммунитета к герпетическим инфекциям у детей, воспитывающихся в детских домах. *Практическая медицина*. 2008; (6): 64.
48. Котлова В.Б., Кокорева С.П., Аралова Е.В., Разуваев О.А. Эпштейна–Барр вирусная инфекция в перинатологии. *Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке*. 2013; 15(8): 3–9.
49. Жебрун А.Б., Куляшова Л.Б., Ермоленко К.Д., Закревская А.В. Распространенность герпесвирусных инфекций у детей и взрослых в С.-Петербурге по данным сероэпидемиологического исследования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 90(6): 30–6.
50. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Блох А.И. Распространённость антител к вирусу Эпштейна–Барр в разных возрастных группах населения Европы и Азии: систематический обзор и метаанализ. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2021; 65(3): 276–86. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2021-65-3-276-286>
51. Львов Н.Д., Дудукина Е.А. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна–Барр вирусной инфекции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2013; (3): 24–32.
52. Демина О.И., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Тетова В.Б., Учаева О.Н. Клинические проявления инфекционного мононуклеоза при первичной или реактивированной герпесвирусной инфекции. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2020; 65(1): 37–44. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-1-37-44>
53. Rostgaard K., Balfour H.H. Jr., Jarrett R., Erikstrup C., Pedersen O., Ullum H., et al. Primary Epstein-Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2019; 14(12): e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
54. Kuri A., Jacobs B.M., Vickaryous N., Pakpor J., Middeldorp J.M., Giovannoni G., et al. Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*. 2020; 20(1): 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
55. Трунова О.А., Романенко Т.А., Старенькова О.В., Сусидко В.В. Некоторые аспекты эпидемического процесса Эпштейна–Барр

- вирусной инфекции. *Университетская клиника*. 2017; (3–1): 204–9.
56. Аглымова Т.А., Хаертынова И.М., Нугманов Р.Т., Князева О.Ю. Популяционные аспекты эпидемиологии герпесвирусных инфекций в крупном промышленном городе. *Практическая медицина*. 2017; (4): 56–62.
 57. Бурмагина И.А., Поздеева М.А., Агафонов В.М. Инфекционный мононуклеоз в северном регионе. *Санитарный врач*. 2014; (11): 38–41.
 58. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д. Инфекции, вызванные вирусом Эпштейна–Барра, у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(6): 108–16.
 59. Шостакович-Корецкая Л.Р., Литвин К.Ю., Кушнерова Е.А., Белоконь А.А., Лесничая А.А., Маргитич И.Н. Течение ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр неходжкинских лимфом у пациентов с ВИЧ при разных вариантах терапевтической тактики: клинические случаи. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2018; 7(4): 508–17.
 60. Rosseto J.H.F., Tenório J.R., Mamana A.C., Tozetto-Mendoza T.R., Andrade N.S., Braz-Silva P.H., et al. Epstein-Barr virus oral shedding and viremia and their association with oral hairy leukoplakia in HIV+ individuals. *Oral Dis*. 2021. <https://doi.org/10.1111/odi.14001>
 61. Farisyi M.A., Sufiawati I. Detection of Epstein-Barr virus DNA in saliva of HIV-1-infected individuals with oral hairy leukoplakia. *Oral Dis*. 2020; 26(Suppl. 1): 158–60. <https://doi.org/10.1111/odi.13400>
 62. Chaillon A., Nakazawa M., Rawlings S.A., Curtin G., Caballero G., Scott B., et al. Subclinical cytomegalovirus and Epstein-Barr virus shedding is associated with increasing HIV DNA molecular diversity in Peripheral blood during suppressive antiretroviral therapy. *J. Virol*. 2020; 94(19): e00927-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00927-20>
 63. Кузнецов П.Л., Парыгин С.С. Клинический случай: микст инфицирование гепатитами А, В, D на фоне ВИЧ-инфекции с активацией вируса Эпштейна–Барр. В кн.: *Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы II Международной (72 Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов, II Всероссийского форума медицинских и фармацевтических вузов «За качественное образование»*. Екатеринбург; 2017: 294–9.
 64. Suarez F., Lortholary O., Hermine O., Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven. *Blood*. 2006; 107(8): 3034–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679>
 65. Соломай Т.В., Семенов Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>
 66. 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): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>
 67. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlupova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V., et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel)*. 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
 68. Bunchorntavakul C., Reddy K.R. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections of the liver. *Gastroenterol. Clin. North Am*. 2020; 49(2): 331–46. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.008>
 69. Стерликов С.А., Лисовский С.Н., Кучерявая Д.А., Гордина А.В., Дергачев А.В. Динамика показателя заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации за последние 10 лет. *Туберкулез и социально-значимые заболевания*. 2019; (3): 86–7.
 70. Jackson C., Abubakar I. Ending tuberculosis in risk groups in Europe: challenges from travel and population movement. *Euro Surveill*. 2017; 22(12): 30489. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.12.30489>
 71. Богданова Е.В., Киселевич О.К., Юсубова А.Н., Панова О.В., Стаханов В.А., Батгиров Ф.А. Сопутствующие инфекции у детей, больных туберкулезом. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2008; (7): 59–65.
 72. Синицын М.В., Богородская Е.М., Родина О.В., Кубракова Е.П., Романова Е.Ю., Бугун А.В. Поражение центральной нервной системы у больных туберкулезом в современных эпидемиологических условиях. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(1): 111–20. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-00015>
 73. Мордык А.В., Ситникова С.В., Пузырева Л.В., Назарова О.И., Фурсевич Л.Н. Оценка проявлений ВИЧ-инфекции и результатов лечения пациентов от туберкулеза в специализированном стационаре. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2015; 7(1): 69–75.
 74. Cantan B., Luyt C.E., Martin-Loeches I. Influenza infections and emergent viral infections in intensive care unit. *Semin. Respir. Crit. Care Med*. 2019; 40(4): 488–97. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693497>
 75. Garcia-Martinez F.J., Moreno-Artero E., Jahnke S. SARS-CoV-2 and EBV coinfection. *Med. Clin. (Engl. Ed.)*. 2020; 155(7): 319–20. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.06.010>
 76. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Ведунова С.Л., Лавров В.Ф., Смирнова Д.И. и др. Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40>
 77. Paolucci S., Cassaniti I., Novazzi F., Fiorina L., Piralla A., Comolli G., et al. San Matteo Pavia COVID-19 Task Force. EBV DNA increase in COVID-19 patients with impaired lymphocyte subpopulation count. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 104: 315–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.051>
 78. Gold J.E., Okyay R.A., Licht W.E., Hurley D.J. Investigation of long COVID prevalence and its relationship to Epstein-Barr virus reactivation. *Pathogens*. 2021; 10(6): 763. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060763>
 79. Meng M., Zhang S., Dong X., Sun W., Deng Y., Li W., et al. COVID-19 associated EBV reactivation and effects of ganciclovir treatment. *Immun. Inflamm. Dis*. 2022; 10(4): e597. <https://doi.org/10.1002/iid3.597>
 80. Соломай Т.В., Симонова Е.Г., Семенов Т.А. Научное обоснование создания и перспективы развития системы эпидемиологического надзора за инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022; 21(1): 21–31. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-1-21-31>
 81. Prichard M.N., Keith K.A., Quenelle D.C., Kern E.R. Activity and mechanism of action of N-methanocarboxymidine against herpesvirus and orthopoxvirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50(4): 1336–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1336-1341.2006>
 82. Zaczyn V.L., Gershburg E., Davis M.G., Biron K.K., Pagano J.S. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a benzimidazole L-ribose: novel antiviral mechanism of 5, 6-dichloro-2-(isopropylamino)-1-beta-L-ribofuranosyl-1H-benzimidazole. *J. Virol*. 1999; 73(9): 7271–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7271-7277.1999>
 83. Ville S., Imbert-Marcille B.M., Coste-Burel M., Garandeau C., Meurette A., Cantarovich D., et al. Impact of antiviral prophylaxis in adults Epstein-Barr Virus-seronegative kidney recipients on early and late post-transplantation lymphoproliferative disorder onset: a retrospective cohort study. *Transpl. Int*. 2018; 31(5): 484–94. <https://doi.org/10.1111/tri.13085>
 84. Соломай Т.В., Исаева Е.И., Ветрова Е.Н., Чернышова А.И., Семенов Т.А., Пантелеева Л.Г. Оценка эффективности средств химической дезинфекции в отношении вируса Эпштейна–Барр. *Дезинфекционное дело*. 2021; (3): 40–8. <https://doi.org/10.35411/2076-457X-2021-3-40-48>
 85. Cui X., Snapper C.M. Epstein Barr virus: Development of vaccines and immune cell therapy for EBV-associated diseases. *Front. Immunol*. 2021; 12: 734471. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734471>

REFERENCES

1. Solomay T.V., Semenenko T.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Kornienko M.N., Bosh'yan R.E., et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Analiz riska zdorov'yu*. 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15.eng> (in Russian)
2. Isakov V.A., ed. *Herpesviral Infections in Human: Guidelines for Physicians [Gerpevirusnyye infektsii cheloveka: rukovodstvo dlya vrachey]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
3. Afonas'eva T.M. The meaning of Epstein-Barr virus infection in pregnancy pathology. Perinatal infection of the fetus. *Zdorov'ye*

- i obrazovanie v XXI veke.* 2017; 19(11): 13–7. <https://doi.org/10.26787/mydha-2226-7425-2017-19-11-13-17> (in Russian)
4. Agaeva M.I., Agaeva Z.A. Characteristic features of the course of herpesvirus infections during pregnancy. *Klinicheskiy razbor v obshchey meditsine.* 2022; (1): 49–55. <https://doi.org/10.47407/kr2022.3.1.00118> (in Russian)
 5. Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutel'yan A.V., Bobrova M.V. Epidemiological characteristics of Epstein-Barr virus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 2021; 98(6): 685–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-139> (in Russian)
 6. Greshnyakova V.A., Goryacheva L.G., Nikiforova A.O. Infectious mononucleosis: atypical manifestation. *Detskie infektsii.* 2022; 21(1): 62–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2022-21-1-62-65> (in Russian)
 7. Popkova M.I., Utkin O.V. Features of the epidemic process of infectious mononucleosis in the Nizhny Novgorod region in the modern period. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2021; (4): 79–86. <https://doi.org/10.35627/22195238/202133747986> (in Russian)
 8. Kharitonova L.A., Soboleva N.G. The role of the infectious factor in juvenile rheumatoid arthritis in children. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2018; 63(3): 59–63. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-59-63> (in Russian)
 9. Barkhatova T.V., Senyagina N.E., Krasnov V.V. The spreading of the markers of herpesviral infections in case of chronic pathology of kidneys of children. *Meditsinskiy al'manakh.* 2011; (6): 196–9. (in Russian)
 10. Ruzhentsova T.A., Gorelov A.V. The value of acute respiratory viral infections in the development of chronic heart failure disease in children. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2012; (3): 42–6. (in Russian)
 11. Solomay T.V. Pathology of the gastrointestinal tract in infection caused by the Epstein-Barr virus. *Infektsionnye bolezni: Novosti, mneniya, obuchenie.* 2020; 9(3): 74–8. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-74-78> (in Russian)
 12. Denisov L.A. Federal project “Strengthening public health” as the most important component of the national project “Demography”. *Sanitarnyy vrach.* 2021; (7): 40–55. <https://doi.org/10.33920/med-08-2107-04> (in Russian)
 13. Cui X., Cao Z., Chen Q., Arjunaraja S., Snow A.L., Snapper C.M. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine.* 2016; 34(34): 4050–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.021>
 14. Correia S., Bridges R., Wegner F., Venturini C., Palser A., Middeldorp J.M., et al. Sequence variation of Epstein-Barr virus: viral types, geography, codon usage, and diseases. *J. Virol.* 2018; 92(22): e01132–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
 15. Popkova M.I., Utkin O.V. Genetic diversity of the Epstein-Barr virus: a modern view of the problem. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2022; 99(1): 93–108. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-228> (in Russian)
 16. Sullivan K., Isabel S., Khodai-Booran N., Paton T.A., Abdunoor M., Dipchand A.I., et al. Epstein-Barr virus latent gene EBNA-1 genetic diversity among transplant patients compared with patients with infectious mononucleosis. *Clin. Transplant.* 2019; 33(4): e13504. <https://doi.org/10.1111/ctr.13504>
 17. Borozan I., Zapatka M., Frappier L., Ferretti V. Analysis of Epstein-Barr virus genomes and expression profiles in gastric adenocarcinoma. *J. Virol.* 2018; 92(2): e01239–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01239-17>
 18. Luo B., Liu M., Chao Y., Wang Y., Jing Y., Sun Z. Characterization of Epstein-Barr virus gp350/220 gene variants in virus isolates from gastric carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Arch. Virol.* 2012; 157(2): 207–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1148-z>
 19. Weiss E.R., Alter G., Ogembo J.G., Henderson J.L., Tabak B., Bakış Y., et al. High Epstein-Barr virus load and genomic diversity are associated with generation of gp350-specific neutralizing antibodies following acute infectious mononucleosis. *J. Virol.* 2016; 91(1): e01562–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01562-16>
 20. Farrell P.J., White R.E. Do Epstein-Barr virus mutations and natural genome sequence variations contribute to disease? *Biomolecules.* 2021; 12(1): 17. <https://doi.org/10.3390/biom12010017>
 21. Blazquez A.C., Berenstein A.J., Torres C., Izquierdo A., Lezama C., Moscatelli G., et al. Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein-Barr virus genomes from Argentina and other geographies. *Viruses.* 2021; 13(6): 1172. <https://doi.org/10.3390/v13061172>
 22. Senyuta N.B., Smirnova K.V., Diduk S.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with the Epstein-Barr virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2016; 34(2): 71–5. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75> (in Russian)
 23. Kerr J.R. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J. Clin. Pathol.* 2019; 72(10): 651–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>
 24. Yakushina S.A., Kisteneva L.B. Epstein-Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4): replication strategies. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(4): 191–202. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202> (in Russian)
 25. van Zyl D.G., Mautner J., Delecluse H.J. Progress in EBV vaccines. *Front. Oncol.* 2019; 9: 104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00104>
 26. Shi T., Huang L., Chen Z., Tian J. Characteristics of primary Epstein-Barr virus infection disease spectrum and its reactivation in children, in Suzhou, China. *J. Med. Virol.* 2021; 93(8): 5048–57. <https://doi.org/10.1002/jmv.26941>
 27. Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 2020; 42(2): 131–42. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
 28. Jangra S., Yuen K.S., Botelho M.G., Jin D.Y. Epstein-Barr virus and innate immunity: Friends or Foes? *Microorganisms.* 2019; 7(6): 183. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060183>
 29. Trisko A.A., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V. Peculiarities of cellular immunity in acute Epstein-Barr virus infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2015; 20(4): 13–6. (in Russian)
 30. van den Heuvel D., Jansen M.A., Bell A.I., Rickinson A.B., Jaddoe V.W., van Dongen J.J., et al. Transient reduction in IgA⁺ and IgG⁺ memory B cell numbers in young EBV-seropositive children: the Generation R Study. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101(4): 949–56. <https://doi.org/10.1189/jlb.5VMAB0616-283R>
 31. Nagovitsyna E.B. Modern approaches to diagnostics and treatment of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal.* 2016; (3): 45–50. (in Russian)
 32. Trebukhov A.V., Zhizheleva V.Yu., Mal'tseva M.V., Naydovskaya N.A. Features of the immune status of often and longterm sick children – residents of the Altai territory. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2019; (4): 30–40. <https://doi.org/10.31549/2542-1174-2019-4-30-40> (in Russian)
 33. Solomay T.V., Semenenko T.A., Gotvyanskaya T.P., Konopleva M.V., Davtyan S.A., Suslov A.P., et al. The role of C-reactive protein, neopterin and melatonin in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Immunologiya.* 2021; 42(5): 502–10. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-502-510> (in Russian)
 34. Mutsunguma L.Z., Rodriguez E., Escalante G.M., Muniraju M., Williams J.C., Warden C., et al. Identification of multiple potent neutralizing and non-antibodies against Epstein-Barr virus protein with potential for clinical application and as reagents for mapping immunodominant epitopes. *Virology.* 2019; 536: 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.026>
 35. Sharifpour S., Davoodi Rad K. Seroprevalence of Epstein-Barr virus among children and adults in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* 2020; 34: 100641. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100641>
 36. Mikhneva S.A., Martynov Yu.V., Kukhtevich E.V., Grishina Yu.Yu. Infectious mononucleosis: a spatiotemporal manifestation of the epidemic process. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2018; (10): 50–4. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-307-10-50-54> (in Russian)
 37. Postanogova N.O., Sofronova L.V., Rysinskaya T.K. The prevalence of infectious mononucleosis among children of the Perm region. In: *Proceedings of the Interregional Scientific and Practical Conference with International Participation «Topical Issues of Pediatrics» [Materialy mezhregional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Aktual'nye voprosy pediatrii»].* Perm': Knizhnyy format; 2017: 188–91. (in Russian)
 38. Bayanova T.A., Kudryavtseva D.P., Plotnikova Yu.K., Botvinkin A.D. The change in the incidence of some herpes virus

- infections in populations with a high prevalence of HIV infection. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2019; 11(3): 75–84. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-3-75-84>. (in Russian)
39. Koshy E., Mengting L., Kumar H., Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of zoster: A comprehensive review. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2018; 84(3): 251–62. https://doi.org/10.4103/ijdv.IJDVL_1021_16
 40. James C., Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
 41. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20(4): 202–13. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
 42. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099857>
 43. Sharifipour S., Davoodi Rad K. Seroprevalence of Epstein-Barr virus among children and adults in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* 2020; 34: 100641. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100641>
 44. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., AlMarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0189033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189033>
 45. Zajac P.W., Czarkowska-Paczek B., Wyczałkowska-Tomasik A. Prevalence and molecular epidemiology of CMV and EBV among nurses working in pediatrics, transplantology, and primary health care. *J. Occup. Health.* 2020; 62(1): e12112. <https://doi.org/10.1002/1348-9585.12112>
 46. Akhmedov Yu.A., Mamedov M.K., Dzhavadzade S.H., Soltanov A.A., Magamedli A.Yu. Seropositivity to Epstein-Barr virus among oncological patients and healthy persons living in Azerbaijan. *Biomeditsina (Baku)*. 2018; (2): 6–9. (in Russian)
 47. Astrakhantseva I.V. The state of immunity to herpetic infections in children brought up in orphanages. *Prakticheskaya meditsina.* 2008; (6): 64. (in Russian)
 48. Kotlova V.B., Kokoreva S.P., Aralova E.V., Razuvaev O.A. Epstein-Barr viral infection in perinatology. *Elektronnyy nauchno-obrazovatel'nyy vestnik Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke.* 2013; 15(8): 3–9. (in Russian)
 49. Zhebrun A.B., Kulyashova L.B., Ermolenko K.D., Zakrevskaya A.V. Spread of herpesvirus infections in children and adults in St. Petersburg according to seroepidemiologic study data. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2013; 90(6): 30–6. (in Russian)
 50. Solomay T.V., Semenenko T.A., Blokh A.I. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in different age groups in Europe and Asia: a systematic review and meta-analysis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii.* 2021; 65(3): 276–86. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2021-65-3-276-286> (in Russian)
 51. L'vov N.D., Dudukina E.A. Key issues of current and diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2013; (3): 24–32. (in Russian)
 52. Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. Clinical manifestations of infectious mononucleosis in primary or reactivated herpes virus infection. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2020; 65(1): 37–44. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-1-37-44> (in Russian)
 53. Rostgaard K., Balfour H.H. Jr., Jarrett R., Erikstrup C., Pedersen O., Ullum H., et al. Primary Epstein-Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS One.* 2019; 14(12): e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
 54. Kuri A., Jacobs B.M., Vickaryous N., Pakpoor J., Middeldorp J.M., Giovannoni G., et al. Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health.* 2020; 20(1): 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
 55. Trunova O.A., Romanenko T.A., Staren'kova O.V., Susidko V.V. Some aspects of the epidemic process of Epstein-Barr viral infection. *Universitetskaya klinika.* 2017; (3-1): 204–9. (in Russian)
 56. Aglyamova T.A., Khaertynova I.M., Nugmanov R.T., Knyazeva O.Yu. Population aspects of the epidemiology of herpes viral infections in a large industrial city. *Prakticheskaya meditsina.* 2017; (4): 56–62. (in Russian)
 57. Burmagina I.A., Pozdeeva M.A., Agafonov V.M. Infectious mononucleosis the northern region. *Sanitarnyy vrach.* 2014; (11): 38–41. (in Russian)
 58. Puzyreva L.V., Safonov A.D. Infections caused by the Epstein-Barr virus in HIV-infected patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; 93(6): 108–16. (in Russian)
 59. Shostakovich-Koretskaya L.R., Litvin K.Yu., Kushnerova E.A., Belokon' A.A., Lesnichaya A.A., Margitich I.N. The course of non-Hodgkin's lymphomas associated with Epstein-Barr in patients with HIV with different variants of therapeutic tactics: clinical cases. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya.* 2018; 7(4): 508–17. (in Russian)
 60. Rosseto J.H.F., Tenório J.R., Mamana A.C., Tozetto-Mendoza T.R., Andrade N.S., Braz-Silva P.H., et al. Epstein-Barr virus oral shedding and viremia and their association with oral hairy leukoplakia in HIV+ individuals. *Oral Dis.* 2021. <https://doi.org/10.1111/odi.14001>
 61. Farisyi M.A., Sufiawati I. Detection of Epstein-Barr virus DNA in saliva of HIV-1-infected individuals with oral hairy leukoplakia. *Oral Dis.* 2020; 26(Suppl. 1): 158–60. <https://doi.org/10.1111/odi.13400>
 62. Chaillon A., Nakazawa M., Rawlings S.A., Curtin G., Caballero G., Scott B., et al. Subclinical cytomegalovirus and Epstein-Barr virus shedding is associated with increasing HIV DNA molecular diversity in Peripheral blood during suppressive antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2020; 94(19): e00927-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00927-20>
 63. Kuznetsov P.L., Parygin S.S. Clinical cases: mixed infection with hepatitis A, B, D against HIV infection with activation of the Epstein-Barr virus. In: «Topical Issues of Modern Medical Science and Healthcare»: Materials of the II International (72 All-Russian) Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students, the II All-Russian Forum of Medical and Pharmaceutical Universities «For Quality Education» [«Aktual'nye voprosy sovremennoy meditsinskoy nauki i zdravoohraneniya»: Materialy II Mezhdunarodnoy (72 Vserossiyskoy) nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchennykh i studentov, II Vserossiyskogo foruma meditsinskikh i farmatsevticheskikh vuzov «Za kachestvennoe obrazovanie»]. Ekaterinburg; 2017: 294–9. (in Russian)
 64. Suarez F., Lortholary O., Hermine O., Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven. *Blood.* 2006; 107(8): 3034–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679>
 65. Solomay T.V., Semenenko T.A. Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34> (in Russian)
 66. 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.* 2019; 64(5): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220> (in Russian)
 67. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlopova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V., et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel).* 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
 68. Bunchorntavakul C., Reddy K.R. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections of the liver. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2020; 49(2): 331–46. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.008>
 69. Sterlikov S.A., Lisovskiy S.N., Kucheryavaya D.A., Gordina A.V., Dergachev A.V. Dynamics of tuberculosis incidence in the Russian Federation over the past 10 years. *Tuberkulez i sotsial'no-znachimye zabolevaniya.* 2019; (3): 86–7. (in Russian)
 70. Jackson C., Abubakar I. Ending tuberculosis in risk groups in Europe: challenges from travel and population movement. *Euro Surveill.* 2017; 22(12): 30489. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.12.30489>
 71. Bogdanova E.V., Kiselevich O.K., Yusubova A.N., Panova O.V., Stakhanov V.A., Batyrov F.A. Accompanying infections in children with TB. *Vestnik Rossiyskogo universiteta družby narodov. Seriya: Meditsina.* 2008; (7): 59–65. (in Russian)
 72. Sinitsyn M.V., Bogorodskaya E.M., Rodina O.V., Kubrakova E.P., Romanova E.Yu., Bugun A.V. The damage of the central nervous system in the patients with tuberculosis in modern epidemiological conditions. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.*

- 2018; 7(1): 111–20. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-00015> (in Russian)
73. Mordyk A.V., Sitnikova S.V., Puzyreva L.V., Nazarova O.I., Fursevich L.N. Manifestations of HIV infection associated with the results of treatment of tuberculosis in patients admitted to a specialized hospital. *VICh-infektsiya i immunosupressii*. 2015; 7(1): 69–75. (in Russian)
74. Cantan B., Luyt C.E., Martin-Loeches I. Influenza infections and emergent viral infections in intensive care unit. *Semin. Respir. Crit. Care Med*. 2019; 40(4): 488–97. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693497>
75. García-Martínez F.J., Moreno-Artero E., Jahnke S. SARS-CoV-2 and EBV coinfection. *Med. Clin. (Engl. Ed.)*. 2020; 155(7): 319–20. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.06.010>
76. Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Vedunova S.L., Lavrov V.F., Smirnova D.I., et al. Reactivation of Epstein-Barr virus (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4) infection during Covid-19: epidemiological features. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 152–61. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40> (in Russian)
77. Paolucci S., Cassaniti I., Novazzi F., Fiorina L., Piralla A., Comolli G., et al. San Matteo Pavia COVID-19 Task Force. EBV DNA increase in COVID-19 patients with impaired lymphocyte subpopulation count. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 104: 315–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.051>
78. Gold J.E., Okyay R.A., Licht W.E., Hurley D.J. Investigation of long COVID prevalence and its relationship to Epstein-Barr virus reactivation. *Pathogens*. 2021; 10(6): 763. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060763>
79. Meng M., Zhang S., Dong X., Sun W., Deng Y., Li W., et al. COVID-19 associated EBV reactivation and effects of ganciclovir treatment. *Immun. Inflamm. Dis*. 2022; 10(4): e597. <https://doi.org/10.1002/iid3.597>
80. Solomay T.V., Simonova E.G., Semenenko T.A. Scientific substantiation of the creation and prospects for the development of an epidemiological surveillance system for infection caused by the Epstein-Barr virus. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2022; 21(1): 21–31. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-1-21-31> (in Russian)
81. Prichard M.N., Keith K.A., Quenelle D.C., Kern E.R. Activity and mechanism of action of N-methanocarbothymidine against herpesvirus and orthopoxvirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50(4): 1336–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1336-1341.2006>
82. Zaczny V.L., Gershburg E., Davis M.G., Biron K.K., Pagano J.S. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a benzimidazole L-riboside: novel antiviral mechanism of 5, 6-dichloro-2-(isopropylamino)-1-beta-L-ribofuranosyl-1H-benzimidazole. *J. Virol*. 1999; 73(9): 7271–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7271-7277.1999>
83. Ville S., Imbert-Marcille B.M., Coste-Burel M., Garandeau C., Meurette A., Cantarovitch D., et al. Impact of antiviral prophylaxis in adults Epstein-Barr Virus-seronegative kidney recipients on early and late post-transplantation lymphoproliferative disorder onset: a retrospective cohort study. *Transpl. Int*. 2018; 31(5): 484–94. <https://doi.org/10.1111/tri.13085>
84. Solomay T.V., Isaeva E.I., Vetrova E.N., Chernyshova A.I., Semenenko T.A., Panteleeva L.G. Evaluation of the effectiveness of chemical disinfection agents against the Epstein-Barr virus. *Dez-infektsionnoe delo*. 2021; (3): 40–8. <https://doi.org/10.35411/2076-457X-2021-3-40-48> (in Russian)
85. Cui X., Snapper C.M. Epstein Barr virus: Development of vaccines and immune cell therapy for EBV-associated diseases. *Front. Immunol*. 2021; 12: 734471. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734471>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Перспектива применения препаратов на основе явления РНК-интерференции против ВИЧ-инфекции

Пашков Е.А.^{1,2}, Пак А.В.¹, Пашков Е.П.¹, Быков А.С.¹, Буданова Е.В.¹, Поддубиков А.В.², Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия

На сегодняшний день вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV) является одной из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения. С момента открытия в 1978 г. он унёс жизни более 35 млн человек, а число инфицированных сегодня достигает 37 млн человек. При отсутствии высокоактивной антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекция характеризуется неуклонным снижением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, однако её проявления способны затронуть центральную нервную, сердечно-сосудистую, пищеварительную, эндокринную и мочеполовую системы. Одновременно с этим особую опасность представляют осложнения, индуцированные представителями патогенной и условно-патогенной микрофлоры, которые могут привести к развитию сопутствующих бактериальных, грибковых и вирусных инфекций. Следует учитывать, что важной проблемой является возникновение вирусов, устойчивых к традиционным лекарственным препаратам, а также токсичность самих лекарственных средств для организма. В контексте настоящего обзора особый интерес представляет оценка перспективности создания и клинического применения препаратов на основе малых интерферирующих РНК, направленных на подавление репродукции ВИЧ, с учётом опыта подобных исследований, проведённых ранее. РНК-интерференция – каскад регуляторных реакций в эукариотических клетках, в результате которого происходит деградация чужеродной матричной РНК. Разработка препаратов на основе механизма РНК-интерференции позволит преодолеть проблему вирусной резистентности. Наряду с этим данная технология позволяет оперативно реагировать на случаи возникновения вспышек новых вирусных заболеваний.

Ключевые слова: *ВИЧ-1; HIV; малые интерферирующие РНК; нокаут гена; обзор; лекарственная резистентность*

Для цитирования: Пашков Е.А., Пак А.В., Пашков Е.П., Быков А.С., Буданова Е.В., Поддубиков А.В., Свитич О.А., Зверев В.В. Перспектива применения препаратов на основе явления РНК-интерференции против ВИЧ-инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(4): 278-289. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>

Для корреспонденции: Пашков Евгений Алексеевич, младший научный сотрудник «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия. E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Участие авторов: Пашков Е.А., Пашков Е.П., Быков А.С. – сбор и обработка материалов; Пашков Е.А., Пак А.В., Поддубиков А.В. – написание текста, заключение; Буданова Е.В., Быков А.С. – научное редактирование; Свитич О.А., Пашков Е.П., Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

Финансирование. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова за поддержку и вклад в проведение работы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Поступила 08.06.2022
Принята в печать 11.08.2022
Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>

The prospects for the use of drugs based on the phenomenon of RNA interference against HIV infection

Evgenij A. Pashkov^{1,2}, Anastasia V. Pak¹, Evgenij P. Pashkov¹, Anatoliy S. Bykov¹, Elena V. Budanova¹, Alexander V. Poddubikov², Oxana A. Svitich^{1,2}, Vitaly V. Zverev^{1,2}

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera", Moscow, Russia

The human immunodeficiency virus (HIV) is currently one of the most pressing global health problems. Since its discovery in 1978, HIV has claimed the lives of more than 35 million people, and the number of people infected today reaches 37 million. In the absence of highly active antiretroviral therapy (HAART), HIV infection is characterized by a steady decrease in the number of CD4⁺ T-lymphocytes, but its manifestations can affect the central nervous, cardiovascular, digestive, endocrine and genitourinary systems. At the same time, complications induced by representatives of pathogenic and opportunistic microflora, which can lead to the development of bacterial, fungal and viral concomitant infections, are of particular danger. It should be borne in mind that an important problem is the emergence of viruses resistant to standard therapy, as well as the toxicity of the drugs themselves for the body. In the context of this review, of particular interest is the assessment of the prospects for the creation and clinical use of drugs based on small interfering RNAs aimed at suppressing the reproduction of HIV, taking into account the experience of similar studies conducted earlier. RNA interference is a cascade of regulatory reactions in eukaryotic cells, which results in the degradation of foreign messenger RNA. The development of drugs based on the mechanism of RNA interference will overcome the problem of viral resistance. Along with this, this technology makes it possible to quickly respond to outbreaks of new viral diseases.

Keywords: *HIV-1; HIV; small interfering RNA; gene knockdown; review; drug resistance*

For citation: Pashkov E.A., Pak A.V., Pashkov E.P., Bykov A.S., Budanova E.V., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V. The prospects for the use of drugs based on the phenomenon of RNA interference against HIV infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 278-289 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>

For correspondence: Evgenij A. Pashkov, Junior Researcher of Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera", 105064, Moscow, Russia. E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Information about the authors:

Pashkov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Pak A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

Pashkov E.P., <https://orcid.org/0000-0002-4963-5053>

Bykov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>

Budanova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Contribution: Pashkov E.A., Pashkov E.P., Bykov A.S. – collection and processing of materials; Pashkov E.A., Pak A.V., Poddubikov A.V. – writing the text, conclusion; Budanova E.V., Bykov A.S. – scientific editing; CV, Svitich O.A., Pashkov E.P., Zverev V.V. – general version.

Financing. The study was carried out using the scientific equipment of the Center for Collective Use «NIIVS named after I.I. Mechnikov» – with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of Russia, Agreement No. 075-15-2021-676 dated 07/28/2021.

Acknowledgements. The authors are grateful to the Center for Collective Use of the Research Institute of Vaccines and Serums named after I.I. Mechnikov for support and contribution to the work.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Received 08 June 2022
 Accepted 11 August 2022
 Published 31 August 2022

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV) является одной из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения на сегодняшний день. С момента регистрации первого случая в 1978 г. ВИЧ унёс жиз-

ни более 35 млн человек, а число инфицированных сегодня достигает 37 млн человек [1]. Возбудитель ВИЧ-инфекции принадлежит к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus* и делится на два вида – ВИЧ-1 и ВИЧ-2 [2]. Особую клиническую значимость представляет ВИЧ-1, поскольку он распространён

по всему миру, в то время как ВИЧ-2 менее патогенен и встречается в основном в районах Западной Африки [3]. При отсутствии высокоактивной антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекция характеризуется неуклонным снижением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, однако её проявления способны затронуть центральную нервную, сердечно-сосудистую, пищеварительную, эндокринную и мочеполовую системы [4–9]. Помимо этого, у пациентов с выраженной иммуносупрессией особую опасность представляют осложнения, индуцированные представителями патогенной и условно-патогенной микрофлоры, которые могут привести к развитию сопутствующих бактериальных, грибковых и вирусных инфекций [10–12]. Также важно учитывать, что при сниженной активности иммунитета у ВИЧ-положительных пациентов повышается риск развития таких злокачественных новообразований, как аногенитальный рак, саркома Капоши, В- и Т-клеточные лимфомы [13–15].

Долгое время лечение ВИЧ-инфицированных пациентов считалось затруднительным, поскольку при создании и применении терапевтических препаратов человечество столкнулось с проблемой развития побочных эффектов от этих лекарств и появления вирусной резистентности в результате склонности ВИЧ к высокой мутационной изменчивости [16]. Совокупность этих факторов негативно влияет на терапию ВИЧ-инфекции и сегодня.

В настоящее время для терапии ВИЧ-инфекции существует пять групп антиретровирусных препаратов [17, 18]. В контексте настоящего обзора особый интерес представляют специфические препараты, направленные на подавление репродукции ВИЧ на разных стадиях и разрешённые для клинического применения.

Антиретровирусные препараты, разрешённые для клинического применения

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) – препараты этого ряда, проникая в инфицированную клетку, конвертируются в соответствующие нуклеозид-3-фосфаты и, включаясь в растущую часть вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), терминируют её, поскольку их структура построена таким образом, что дальнейшее удлинение цепи невозможно. В результате действия этих препаратов также конкурентно ингибируется активность обратной транскриптазы ВИЧ-1 и ВИЧ-2 [19]. Следует, однако, учитывать, что многие из препаратов этого класса обладают токсическими и побочными эффектами на организм человека. В отчете U.S. Food and Drug Administration приводятся данные о том, что применение *ламивудина* у ряда пациентов сопровождалось головной болью, тошнотой, кашлем и утомляемостью [20]. Также при его использовании у пациентов с почечной недостаточностью необходим тщательный подбор дозировки, а в некоторых случаях у ряда пациентов существует риск развития панкреатита [21, 22]. *Тенофовир* приводит к нефротоксическому эффекту, нарушению структуры костной ткани и повышению уровня липопротеинов низкой

(ЛПНП) и высокой плотности [23–26]. Применение *зидовудина* также вызывает ряд побочных эффектов, таких как жировой гепатоз печени, лактоацидоз, анемия, нейтропения и миелосупрессия [27, 28]. Дополнительным недостатком препаратов этого ряда является то, что ВИЧ способен быстро приобретать к ним резистентность посредством избирательного ускользания обратной транскриптазы от включения аналогов нуклеотидов ДНК. Наиболее распространённые мутации в этой категории включают K65R, L74V, Q151M и M184V [29–31].

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ) являются неконкурентными ингибиторами фермента, которые связываются с аллостерическим центром обратной транскриптазы, влияющим на мобильность и гибкость центра полимеризации, приводя к резкому снижению эффективности обратной транскриптазы ВИЧ-1 [32]. Препараты ННИОТ также имеют ряд побочных эффектов. *Эфавиренз* способен вызвать повышение уровня трансаминаз в крови, гиперлипидемию, а также депрессивные состояния у пациентов, преимущественно чернокожих [33–35]. Использование *рилпивирина*, по данным С. Cohen и соавт., связано с нарушением сердечного ритма, возникновением психических и неврологических расстройств [36]. Резистентность к ННИОТ обусловлена нарушением связывания обратной транскриптазы с компонентом лекарственного препарата в результате стерического препятствия размещению ННИОТ в сайте связывания, утраты взаимодействия с аминокислотными остатками внутри сайта связывания и опосредованного уменьшения скорости связывания ННИОТ с ОТ [37–39].

Ингибиторы протеаз (ИП) ингибируют репродукцию ВИЧ, связываясь с активным центром фермента протеазы ВИЧ. Известно, что приём этих препаратов способен спровоцировать развитие сахарного диабета, повысить уровень ЛПНП крови. Помимо этого, существуют побочные эффекты со стороны пищеварительной системы: диарея, рвота, тошнота, боль в животе [40, 41].

Антагонисты хемокиновых рецепторов препятствуют связыванию вириона ВИЧ с клеткой человека путём ингибирования блокировки CCR5 корецептора, предотвращая связывание с ним вирусного белка gp120 и таким образом нарушая проникновение вируса в клетку [17]. Следует иметь в виду, что препарат не влияет на рецептор CXCR4, который также используется вирусом для входа в клетку. По данным клинических исследований, не отмечалось достоверной разницы между применением препарата *маравирок* и плацебо [42].

Исходя из этого, в настоящее время остро стоит вопрос формирования вирусной резистентности к противовирусным препаратам и возникновения нежелательных побочных эффектов. Для решения этих проблем необходимы принципиально новые антивирусные препараты. Одна из таких перспективных технологий создания специфических противовирусных препаратов основана на механизме РНК-интерференции (рибонуклеиновая кислота).

На сегодняшний день существуют несколько препаратов, используемых для терапии заболеваний инфекционного характера либо находящихся на стадии клинических испытаний. Были показаны многообещающие результаты при испытаниях таких препаратов, как *ARC-520* (терапия вирусного гепатита В), *Miravirsen* (терапия вирусного гепатита С), *ALN-RSV01* (терапия инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом) [43–45]. Следует иметь в виду, что на стадии клинических испытаний также находится миРНК-препарат (малые interfering (некодирующие) РНК), потенциально пригодный для терапии ВИЧ-инфекции – *pHIV7-shITAR-CCR5RZ* [45].

РНК-интерференция – один из регуляторных путей, при котором происходит снижение экспрессии гена-мишени в результате нокдауна целевой матричной РНК (мРНК). Также показано, что при РНК-интерференции мРНК двухцепочечная РНК (дцРНК), которая определяет комплементарный участок мишени мРНК, эффективнее, чем одноцепочечная РНК (оцРНК), и что для нокдауна генов достаточно лишь короткого фрагмента дцРНК. Механизм РНК-интерференции заключается в том, что белок-эндонуклеаза *Dicer* разрезает чужеродную дцРНК на отдельные двухцепочечные фрагменты длиной до 25 пар нуклеотидов, которые и являются миРНК. Затем происходит связывание миРНК с комплексом белков *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) с последующим распознаванием и разрушением этой структурой мРНК-мишени [46].

Целью данного обзора является оценка перспективности создания и клинического применения препаратов на основе миРНК, направленных на подавление репродукции ВИЧ.

Разработка малых interfering (некодирующих) РНК-препаратов

Стандартным подходом к разработке противовирусных средств на основе явления РНК-интерференции является подбор миРНК, действие которых направлено на вирусный геном [47]. Данный подход был успешно испытан в одной из ранних работ С.Д. Novina и соавт. с использованием модельных штаммов ВИЧ-1 HIV_{IIIb} и R7-GFP [48] на клеточных культурах HeLa-CD4 и H9. Авторы подобрали специфичную миРНК p24-siRNA к гену *gag*, кодирующему экспрессию белка p24, проводили трансфекцию клеток HeLa-CD4 и через 24 ч заражали трансфицированные клетки HIV_{IIIb}. Через 48 ч после заражения авторами отмечалось четырёхкратное снижение белка по результатам проточной цитометрии. Кроме того, снижение количества мРНК белка p24 отмечалось при нозерн-блоттинге. По прошествии пяти суток вирусная репродукция оценивалась методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментный анализ (ИФА)). В клетках, обработанных миРНК p24-siRNA, количество белка p24 снижалось в 25 раз, по сравнению с контрольными клетками. Полученные результаты были подтверждены повторно. С.Д. Novina и соавт. также продемонстрировали снижение вирусной репродукции в клетках H9, в которые

трансфицировали миРНК к GFP (green fluorescence protein). Далее авторы заражали эти клетки штаммом R7-GFP, в котором ген *nef* был заменён на ген *GFP*. Снижение экспрессии белка p24 и GFP прослеживалось в клетках H9 через два дня после трансфекции GFP-миРНК, а на пятые сутки экспрессия этих белков снизилась в 4 раза. С.Д. Novina и соавт. утверждают, что векторные стратегии являются особо перспективными в вопросе терапии и профилактики ВИЧ-инфекции [48].

В исследовании G.A. Coburn и B.R. Cullen приводятся данные о блокировке экспрессии вирусных генов *tat* и *rev* в клеточной линии 293Т, а также о снижении репродукции ВИЧ-1 в культуре первичных Т-клеток человека. Для оценки влияния миРНК, специфичных к генам *tat* и *rev*, авторы трансфицировали клетки 293Т плазмидами pTat и pRev, кодирующими экспрессию указанных генов. Клетки также котрансфицировали одной из специфичных миРНК и в качестве неспецифического контроля – одноцепочечной антисмысловой нитью миРНК. По результатам вестерн-блота было показано выраженное снижение экспрессии белков *tat* и *rev*, по сравнению с неспецифическим контролем. В ряде повторов трансфекций было установлено небольшое (~20%) влияние специфичной для *rev* миРНК на экспрессию белка *tat* и специфичной для *tat* миРНК – на экспрессию *rev*. Далее авторы показывают результаты блокировки репродукции ВИЧ-1 с помощью миРНК в культуре клеток 293Т. Известно, что клеточная линия 293Т не восприимчива в отношении к ВИЧ-1, однако при трансфекции плазмид, несущих гены, кодирующие экспрессию рецептора CD4 и корецептора CCR5, это возможно. Авторы выполнили трансфекцию провирусных плазмид pNL-ADA и pNL-luc-ADA в клетки 293Т. Вирус NL-ADA представляет собой способный к репродукции ВИЧ-1 из изолята NL4-3, у которого ген *env* был изменён на ген *env*, полученный из CCR5-тропного изолята ВИЧ-1 NL-ADA. ВИЧ-1 NL-luc-ADA имеет сходство с NL-ADA, за исключением того, что ген *nef* ВИЧ-1 заменён на ген-индикатор *luc*, что позволяет оценивать вирусную репродукцию по изменению уровня люциферазы. Далее авторами было показано, что миРНК, направленные к генам *tat* и *rev*, особенно в комбинации друг с другом, способны эффективно снижать экспрессию индикаторного гена *luc* в клетках 293Т, трансфицированных pNL-ADA и pNL-luc-ADA, по сравнению с контрольными антисмысловыми олигонуклеотидами РНК. Затем G.A. Coburn и B.R. Cullen проводили оценку способности миРНК к блокировке выхода вирионов ВИЧ-1 из инфицированных 293Т. Было показано, что две миРНК, действующие либо по отдельности, либо в комбинации, действительно были способны эффективно ингибировать продукцию потомства вирионов ВИЧ-1, по сравнению с неспецифическими контролями. В своём исследовании авторы показывают, что специфические миРНК способны эффективно ингибировать репродукцию ВИЧ-1 *in vitro*. Авторы считают, что потенциальная роль

РНК-интерференции в противовирусной защите является вопросом, который заслуживает пристального внимания в будущем, а миРНК можно использовать для избирательной блокировки экспрессии вирусных генов человека [49].

В работе М. Науафуне и соавт. показано противовирусное действие четырёх миРНК (E7145, E74900, E7457, E7361), направленных к разным областям гена *env* ВИЧ-1. Для оценки эффективности нокдауна выбранного гена авторы трансфицировали в клетки COS провирусные экспрессионные плазмиды ВИЧ-1 (pNL4-3). Вирусную репродукцию в культуральной жидкости оценивали через 3 дня с помощью теста HIV-1 p24 CLEIA20 и сравнивали с заражённым не-трансфицированным контролем. Было показано, что каждая из четырёх миРНК ингибировала активность гена *env*. В клетках, трансфицированных миРНК E7145, нацеленной на центральную область петли V3, и E7490, нацеленной на сайт связывания CD4 консервативных областей *gp120*, экспрессия p24 снижалась на 2.2 и 2.5 Ig_{10} соответственно, по сравнению с вирусным контролем. При использовании миРНК E7457 отмечалось более выраженное снижение экспрессии p24, по сравнению с миРНК E7361, специфичной к межсубъединичной дисульфидной связи *gp120*. Далее М. Науафуне и соавт. оценили дозозависимый эффект при использовании миРНК. Для его оценки авторы выполнили трансфекцию этих же миРНК в культуру клеток COS с концентрациями от 0,02 до 0,5 мкг. Было показано, что наилучший результат продемонстрировали миРНК E7145 и E7490 при используемой концентрации 0,5 мкг. Для оценки противовирусного действия в инфицированных клетках авторы трансфицировали миРНК E7145, E7490, E7457 и E7361 в клетки HeLa-CD4⁺. После четырёх-часовой инкубации трансфицированные клетки заражались штаммом ВИЧ-1 NL4-3. Вирусную репродукцию оценивали на седьмые сутки с помощью теста HIV-1 p24 CLEIA. Каждая из миРНК, нацеленных на ген *env*, эффективно снижала репродукцию ВИЧ-1 NL4-3 более чем в 10 раз, по сравнению с вирусным контролем. М. Науафуне и соавт. утверждают, что применение явления РНК-интерференции с несколькими миРНК одновременно, нацеленными на различные области генов, специфичных для ВИЧ-1, способны преодолеть проблему появления лекарственно-устойчивых штаммов [50].

Для оценки закономерностей мутационной изменчивости ВИЧ-1 подтипа А и разработки подходов генной терапии с использованием РНК-интерференции в работе О.В. Кретова и соавт. проводилось сверхглубокое секвенирование участков генома ВИЧ-1, полученного из двух независимых групп пациентов из России. В своей работе авторы обнаружили шесть мишеней для миРНК, которые консервативны для 82–97% исследованных последовательностей и расположены внутри доменов, кодирующих ОТ (A1, A2), интегразу (A3), *vpr* (A4), *gp120* (A5) и *p17* (A6). Исходя из этого, О.В. Кретова и соавт. далее провели анализ на наличие идентичных мишеней в разных изолятах ВИЧ-1

подтипа А со всего мира с использованием программного обеспечения BLAST. Было установлено, что мишени, идентичные последовательности A1 – A3, A4 и A6, были обнаружены практически повсеместно. Идентичные последовательности обнаруживались в большинстве результатов: в 4956 последовательностях ВИЧ-1 (99%) для A6, 4837 последовательностях (96,7%) для A2 и 4651 последовательностях (93%) для A1. Мишень A3 не была так широко распространена и обнаруживалась в 1395 последовательностях (27,9%). Отмечалось широкое распространение мишени A2 в изолятах из США, Великобритании, Швейцарии и Германии. Мишень A6 характерна для изолятов из Кении, США, Великобритании, Швейцарии и Таиланда. Авторы делают вывод, что мишени, обнаруженные с помощью глубокого секвенирования примерно в 90% образцов ВИЧ-1 из России, также присутствуют во многих образцах ВИЧ-1 по всему миру. Полученные результаты, по мнению авторов, свидетельствуют, что обнаруженные консервативные области могут быть использованы в качестве мишеней для миРНК [51].

С целью оценки противовирусного эффекта миРНК, направленных к консервативным областям генов *gp41*, *nef*, *tat* и *rev*, R.S. Dave и соавт. синтезировали 9 молекул миРНК: *1tat*, *2gp41*, *3gp41/rev*, *4gp41/rev*, *5gp41*, *6gp41*, *7nef*, *8nef* и *9nef*. миРНК *3gp41/rev* и *4gp41/rev* были комплексно направлены к двум генам одновременно. Чтобы оценить активность данных миРНК по отношению к ВИЧ-1 (штамм NL4-3), авторы трансфицировали клетки HeLaCD4 этими миРНК. Далее трансфицированные клетки заражали ВИЧ-1 NL4-3 при множественности заражения 0.1 и измеряли количество белка p24 в надосадочной жидкости заражённых клеток методом ELISA на первые, вторые и третьи сутки. Было показано, что в клетках, обработанных миРНК *1tat*, *3gp41/rev*, *6gp41*, количество антигена p24 уменьшалось до 50%, по сравнению с вирусным и неспецифическим контролем. На вторые сутки каждая из девяти миРНК оказывала противовирусный эффект. Наиболее эффективное снижение p24 отмечалось в клетках, трансфицированных миРНК *5gp41*, *6gp41* и *8nef* в 31, 24 и 37% соответственно. Схожие результаты отмечались при использовании данных миРНК на третьи сутки. миРНК *5gp41*, *6gp41* и *8nef* продолжали оказывать противовирусное действие, снижая количество p24 на 20, 20 и 33% соответственно. Авторы отмечают, что уникальная динамика репродукции ВИЧ-1 в макрофагах и отсутствие цитопатического эффекта обеспечивают высокую выживаемость макрофагов после заражения, что превращает их в резервуар для вирусов [52]. Известно, что макрофаги представляют собой ключевую мишень ВИЧ-1 *in vivo*. Параллельно с этим утверждается, что они также являются основными мишенями ВИЧ-1 в нервной системе [53]. Исходя из этого, R.S. Dave и соавт. проводят оценку влияния миРНК *5gp41*, *6gp41* и *8nef* в макрофагах по отношению к нейротропному штамму ВИЧ-1 YU-2. Авторы трансфицировали первичные макрофаги че-

ловека указанными миРНК, а затем заражали ВИЧ-1 YU-2 при множественности заражения 0,1. После этого проводилась оценка количества вирусного белка р24 методом ELISA. Было показано, что ко вторым суткам отсутствовал выраженный противовирусный эффект, однако к девятым суткам снижение белка р24 достигало 46%, по сравнению с вирусным и неспецифическим контролем. В своём исследовании R.S. Dave и соавт. утверждают, что нерешённым остаётся вопрос эффективной доставки миРНК, специфичных по отношению к генам ВИЧ-1. Решение этой проблемы позволит разработать эффективные терапевтические средства на основе технологии РНК-интерференции [54].

В табл. 1 представлены вирусные гены-мишени, подавление которых приводило к эффективному снижению репродукции вируса ВИЧ, по данным независимых исследований.

Учитывая высокую склонность ВИЧ к мутационной изменчивости, особый смысл имеет подавлять активность тех клеточных генов, чьи продукты экспрессии играют важную роль в вирусной репродукции [16]. Аналогичное мнение в отношении вируса гриппа, также обладающего высокой изменчивостью, высказывается в работе M. Lesch и соавт. [55].

Эффективность применения миРНК, направленных на снижение экспрессии генов, ответственных за экспрессию белков, необходимых для репродукции ВИЧ-1, исследовалась в работах по полногеномному миРНК-скринингу. В одной из ранних работ A.L. Brass и соавт. с использованием двухэтапного подхода в миРНК-скрининге обнаружили 273 клеточных факторов, которые необходимы для жизненного цикла ВИЧ-1. Из них было определено 36 клеточных факторов (13%), ранее участвовавших в патогенезе ВИЧ-1 на ранних стадиях, включая CD4, CXCR4, NMT1, Rab9p40, и компоненты путей трансактивации NF-κB и CREB. Авторы сообщают, что среди оставшихся 237 генов более 100 генов-мишеней, чей нокдаун также приводил к снижению вирусной репродукции. Далее отмечается, что анализ выявил ранее неизвестную роль ретроградных транспортных белков аппарата Гольджи (Rab6 и Vps53) в проникновении вируса, кариоферина (TNPO3) в вирусной интеграции и медиаторного комплекса (Med28) в вирусной транскрипции. Для скрининга мы использовали клетки TZM-bl (вариант HeLa), которые экспрессируют эндогенный CXCR4, трансгенный CD4 и CCR5, а также интегрированный Tat-зависимый репортерный ген β-галактозидазы (β-Gal). A.L. Brass и соавт.

Таблица 1. Вирусные гены, нокдаун которых приводил к значительному снижению репродукции ВИЧ

Table 1. Viral genes, knockdown of which led to a significant decrease in the reproduction of HIV

Название гена Gene name	Функция гена Gene function	Источник References
<i>gag</i>	Синтез белка – предшественника капсида p55, расщепляющегося на p24, p7, p13, p15, p17 Synthesis of p55 capsid precursor protein, which is cleaved into p24, p7, p13, p15, p17	C.D. Novina и соавт. [48], O.V. Kretova и соавт. [51], L.A. Wheeler и соавт. [60]
<i>tat</i>	Синтез белка p14, который усиливает опосредованную РНК-полимеразой II элонгацию интегрированной вирусной ДНК, стимулирует транскрипцию провирусной ДНК и транспорт РНК из ядра в цитоплазму клетки The synthesis of the p14 protein, which enhances the RNA polymerase II-mediated elongation of the integrated viral DNA, stimulates the transcription of proviral DNA and the transport of RNA from the nucleus to the cytoplasm of the cell	G.A. Coburn и B.R. Cullen [49], R.S. Dave и соавт. [54]
<i>rev</i>	Синтез регулятора экспрессии вирусных генов (p19), который ускоряет выход вирусных РНК из ядра в цитоплазму клетки и переключение синтеза регуляторных белков на синтез структурных протеинов Synthesis of a viral gene expression regulator (p19), which accelerates the release of viral RNA from the nucleus into the cell cytoplasm and switching the synthesis of regulatory proteins to the synthesis of structural proteins	
<i>env</i>	Кодирует белок gp160, который расщепляется клеточной эндопротеазой фурином в эндоплазматическом ретикулуме на поверхностный гликопротеин gp120 и трансмембранный гликопротеин gp41 Encodes the gp160 protein, which is cleaved by the cellular endoprotease furin in the endoplasmic reticulum into the surface glycoprotein gp120 and the transmembrane glycoprotein gp41	M. Nayafune и соавт. [50], O.V. Kretova и соавт. [51], R.S. Dave и соавт. [54]
<i>Pol</i>	Кодирует ферменты: обратную транскриптазу и РНКазу (p66/51), интегразу (p32) и протеазу (p10) Encodes enzymes: reverse transcriptase and RNase (p66/51), integrase (p32) and protease (p10)	O.V. Kretova и соавт. [51]
<i>vpr</i>	Кодирует синтез вирусного белка U (p16), способствующего деградации CD4 и повышающего высвобождение вирионов из клетки Encodes the viral protein U (p16), which promotes the degradation of CD4 and increases the release of virions from the cell	–
<i>nef</i>	Синтез белкового эффектора (p27/25), усиливающего инфекционные свойства вирионов. Подавление экспрессии молекул CD4 и HLA на поверхности инфицированных клеток Synthesis of a protein effector (p27/25) that enhances the infectious properties of virions. Suppression of expression of CD4 and HLA molecules on the surface of infected cells	R.S. Dave и соавт. [54]
<i>vif</i>	Синтез вирусного инфекционного фактора (p23), способствующего репликации вируса Synthesis of a viral infectious factor (p23) that promotes virus replication	L.A. Wheeler и соавт. [60]

считают, что данные факторы могут быть использованы в качестве мишеней для РНК-интерференции [56].

Перспективность подхода, основанного на снижении экспрессии клеточных генов, важных для размножения ВИЧ-1 также подтверждается в исследовании М. Rodriguez и соавт. В своей работе авторы одними из первых проводили изучение фармакокинетики и эффективности интраназальной доставки комплекса полиэтиленimina и миРНК *siBeclin1* (*PEI-FITCsiRNA*), специфичной по отношению к гену *Beclin1*, в мозг и лёгкие, а также её способность к снижению вирусной репродукции *in vitro*. В начале исследования авторы проводили оценку интраназальной доставки комплекса *PEI-FITCsiRNA* в мозг и лёгкие мышей с помощью тройной флуоресцентной визуализации с использованием меченной флуоресцеином изотиоцианатом (*FITC*) контрольной миРНК. Авторами были получены данные, свидетельствующие о том, что комплекс *PEI-FITCsiRNA* был успешно доставлен в астроциты, микроглию и нейроны головного мозга, а также обнаруживался в реснитчатых эпителиальных клетках лёгких. Далее М. Rodriguez и соавт. оценивали противовирусную активность миРНК *siBeclin1* в клетках первичной микроглии ВИЧ-инфицированного человека с помощью ИФА. Для построения кривой титрования авторы трансфицировали миРНК *siBeclin1* в концентрациях 4, 8 и 16 мкг. По результатам ИФА были получены данные, свидетельствующие о снижении вирусного титра на 50% при концентрации *siBeclin1* 4 мкг и на 75% при концентрации 16 мкг. Авторы считают, что данное исследование показывает эффективность интраназальной доставки *siBeclin1* в качестве терапевтического средства ВИЧ-инфекции и её последствий [57].

В исследовании Л.В.К. Sunnam и соавт. проводилась оценка репродукции ВИЧ-1 (штамм 93IN101) на клеточной модели SupT1 при подавлении активности гена *TOP2B*, ответственного за экспрессию белка топоизомеразы II бета (Торо IIβ), который играет важную роль в клеточной дифференцировке, регулируя экспрессию генов посредством ремоделирования хроматина [58]. Л.В.К. Sunnam и соавт. проводили трансфекцию миРНК в равных концентрациях, специфичной к гену *TOP2B*, в одном случае с помощью наночастиц трансферрина (*Tf-Tfr*), а в другом – с помощью Lipofectamin 2000. Оценка вирусной репродукции проводилась на третьи сутки после трансфекции по результатам измерения оптической плотности. Авторами было установлено, что при использовании данной миРНК в концентрации 200 нг в комплексе с *Tf-Tfr* снижение репродукции ВИЧ-1, по сравнению с вирусным контролем, составило 94,2%. При использовании Lipofectamin 2000 и миРНК с той же концентрацией вирусная репродукция снизилась на 73%, по сравнению с тем же контролем. Авторы считают, что за счёт подавления образования белка Торо IIβ возможно найти решение проблемы в поиске подходящих мишеней для терапии ВИЧ-инфекции, а также предлагают оптимальный метод доставки миРНК к целевым генам [59].

Применение миРНК в качестве средства, обеспечивающего защиту, посредством одновременного нокдауна клеточных и вирусных генов, показано в работе L. Wheeler и соавт. Исследователи проводили оценку снижения вирусной активности *in vitro* и *in vivo* при использовании комплексов миРНК CCR5/CD45-CD4-AsiC, gag/vif-CD4-AsiC, направленных к клеточным генам *CCR5*, *CD45* и вирусным *gag* и *vif*. Было установлено, что CCR5/CD45-CD4-AsiC стабильно подавляют экспрессию генов в течение 3 недель *in vitro*. Авторы трансфицировали указанный комплекс миРНК в клетки CD4⁺ PBMC (peripheral blood mononuclear cell – мононуклеарные клетки периферической крови), затем проводили оценку изменения экспрессии гена *CCR5* с помощью проточной цитометрии в течение 5 недель. Снижение экспрессии до 75% наблюдалось в течение 3 недель, а далее постепенно нарастало, однако к концу пятой недели экспрессия была снижена до 25%, по сравнению с отрицательным контролем. После этого проводилась оценка подавления экспрессии генов-мишеней у гуманизированных мышей BLT путём двукратного интравагинального введения смеси CD4-AsiCs, несущей миРНК к генам *CD45* и *CCR5*. Мышей забивали на 4-й, 8-й и 14-й день после трансфекции. Контрольных мышей забивали на 4-е сутки после введения фосфатно-солевого буфера (PBS) в качестве неспецифического контроля. Экспрессию *CD45* и *CCR5* в клетках CD4⁺ слизистой оболочки влагалища оценивали с помощью проточной цитометрии. Было установлено, что экспрессия указанных генов стабильно снижалась в течение 2 недель в клетках CD4⁺ у трансфицированных мышей, по сравнению с контрольной группой. Применение миРНК без средства доставки ввиду их низкой стабильности не имеет смысла для использования человеком. На фоне этого авторы проводят оценку нокдауна активности *CD45* и *CCR5* при формировании комплекса гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) – CCR5/CD45-CD4-AsiC. L. Wheeler и соавт. установили, что в присутствии вагинальной жидкости комплекс ГЭЦ – CD4-AsiC сохранял свою стабильность, в то время как CCR5/CD45-CD4-AsiC в PBS подвергалась деградации. Чтобы оценить влияние комплекса ГЭЦ – CCR5/CD45-CD4-AsiC на экспрессию генов *CD45* и *CCR5*, авторы проводили его трансфекцию в клетки эксплантатов шейки матки и спустя четверо суток оценивали активности генов *CD45* и *CCR5* методом проточной цитометрии. Было получено, что нокдаун *CD45* и *CCR5* был сходным у мышей, получавших CCR5/CD45-CD4-AsiC в PBS и в комплексе ГЭЦ – CCR5/CD45-CD4-AsiC. Далее авторами было показано, что интравагинальное введение комплексов миРНК CCR5/CD4-AsiC за 48 и 24 ч до заражения или gag/vif-CD4-AsiC за 24 ч до и через 4 ч после заражения приводило к блокировке вагинальной передаче ВИЧ. Было отмечено, что у мышей, получивших в качестве отрицательного контроля раствор фосфатно-солевого буфера, в течение 4 недель после заражения обнаруживался антиген p24 ВИЧ, тогда как у всех мышей, CCR5/CD45-CD4-AsiC или gag/vif-CD4-AsiC, не было признаков инфекции. Их количе-

ство CD4 оставалось нормальным, и ни у кого не было определяемого антигена p24 в плазме выше фона в течение 10 недель наблюдения. L. Wheeler и соавт. считают, что нокдаун вирусных генов *gag/vif* либо клеточных *CCR5/CD45* обеспечивает надежную защиту от передачи ВИЧ-инфекции [60].

В табл. 2 представлен ряд клеточных генов, играющих важную роль в жизненном цикле коронавируса, нокдаун которых приводил к снижению репродукции ВИЧ.

Заключение

На сегодняшний день особо актуальна проблема разработки препаратов, способных эффективно предотвра-

щать заражение ВИЧ и дальнейшее прогрессирование инфекции. Перспективным направлением в её решении может стать использование механизма РНК-интерференции для подавления экспрессии вирусных или клеточных генов, необходимых для дальнейшего жизненного цикла вируса. Важно учитывать, что в настоящее время уже существуют официально одобренные препараты против наследственных заболеваний (*Patisiran* и *Givosiran*), механизм действия которых построен на явлении РНК-интерференции. Это даёт надежду на создание аналогичных противовирусных препаратов, которые будут использоваться в терапии и профилактике ВИЧ-инфекции. Необходимо иметь в виду, что ВИЧ является вирусом, наиболее остро подверженным

Таблица 2. Клеточные гены, нокдаун которых приводил к значительному снижению репродукции ВИЧ
Table 2. Cellular genes, knockdown of which led to a significant decrease in the reproduction of HIV

Название гена Gene name	Функция гена Gene function	Источник Reference
<i>CD4</i>	Выполняет роль корецептора αβTCR: связываясь с инвариантным β2-доменом МНС II класса, участвует в распознавании молекул процессированного антигена, представляемого АПК. Является рецептором для ВИЧ, связываясь через домен D1 с gp120 вируса Acts as an αβTCR co-receptor: by binding to the invariant β2-domain of MHC class II, it is involved in the recognition of molecules of processed antigen represented by APC. It is a receptor for HIV, binding through the D1 domain to viral protein gp120	A.L. Brass и соавт. [56]
<i>CXCR4</i>	Корецептор для ВИЧ Co-receptor for HIV	
<i>NMT1</i>	Участвует в процессе N-миристоилирования, необходимого для полного проявления биологической активности нескольких N-миристоилированных белков, включая альфа-субъединицу белка, связывающего гуаниновые нуклеотиды, передающего сигнал. Participates in the process of N-myristoylation, which is necessary for the full manifestation of the biological activity of several N-myristoylated proteins, including the alpha subunit of the protein that binds guanine nucleotides and transmits a signal	
<i>Rab9p40</i>	Облегчает транспорт маннозо-6-фосфатного рецептора (MPR) из эндосом в сеть транс-Гольджи Facilitates transport of the mannose-6-phosphate receptor (MPR) from endosomes to the trans-Golgi network	
<i>NF-κB</i>	Ядерный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток, контролирующей транскрипцию ДНК, продукцию цитокинов и выживаемость клеток Nuclear factor, an enhancer of the kappa light chain of activated B cells that controls DNA transcription, cytokine production, and cell survival.	
<i>CREB</i>	Клеточный фактор транскрипции Cellular transcription factor	
<i>Rab6</i>	Регулировка мембранного транспорта Regulation of membrane transport	
<i>Vps53</i>	Участие в ретроградном переносе пузырьков у аппарата Гольджи Participation in the retrograde transport of vesicles at the Golgi apparatus	
<i>TNPO3</i>	Рецептор ядерного импорта для белков, богатых серином/аргинином (SR), включая фактор сплайсинга 1 Nuclear import receptor for serine/arginine (SR) rich proteins, including splicing factor 1	
<i>Med28</i>	Репрессор дифференцировки гладкомышечных клеток Repressor of smooth muscle cell differentiation	
<i>Beclin1</i>	Основной компонент комплекса PI3K, который обеспечивает образование фосфатидилинозитол-3-фосфата, являющегося инициатором апоптоза The main component of the PI3K complex, which provides the formation of phosphatidylinositol-3-phosphate, which is the initiator of apoptosis	M. Rodriguez и соавт. [57]
<i>TOP2B</i>	Ремоделирование хроматина Chromatin remodeling	L.B.K. Sunnam и соавт. [59]
<i>CD45</i>	Ген, кодирующий общий лейкоцитарный поверхностный белок CD45 Gene encoding common leukocyte surface protein CD45	L. Wheeler и соавт. [60]
<i>CCR5</i>	Корецептор для ВИЧ Co-receptor for HIV	

Примечание. МНС (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости; АПК – антигенпредставляющие клетки; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа.

Note. MHC, major histocompatibility complex; APC, antigen-presenting cells; PI3K, phosphoinositide-3-kinase.

мутационной изменчивости. На этом фоне применение миРНК, направленных на вирусный геном, может привести к образованию новых резистентных форм. Исходя из этого, регуляция вирусной репродукции, связанная с подавлением активности клеточных генов, в настоящее время является перспективным направлением. Важной проблемой также остаётся создание эффективных средств доставки лекарственного препарата, способных достичь мишени.

ЛИТЕРАТУРА

- ВОЗ. Информационный бюллетень. ВИЧ. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- Nyamweya S., Hegedus A., Jaye A., Rowland-Jones S., Flanagan K.L., Macallan D.C. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* 2013; 23(4): 221–40. <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
- Spudich S.S., Ances B.M. Neurologic complications of HIV infection. *Top. Antivir. Med.* 2012; 20(2): 41–7.
- Vachiat A., McCutcheon K., Tsabedze N., Zachariah D., Manga P. HIV and ischemic heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69(1): 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.979>
- Kearns A., Gordon J., Burdo T.H., Qin X. HIV-1-associated atherosclerosis: unraveling the missing link. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69(25): 3084–98. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.012>
- Ances B.M., Anderson A.M., Letendre S.L. CROI 2021: Neurologic complications of HIV-1 infection or COVID-19. *Top. Antivir. Med.* 2021; 29(2): 334–43.
- Heyns C.F., Groeneveld A.E., Sigarroa N.B. Urologic complications of HIV and AIDS. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2009; 6(1): 32–43. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1273>
- Sim J.H., Mukerji S.S., Russo S.C., Lo J. Gastrointestinal dysfunction and HIV comorbidities. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2021; 18(1): 57–62. <https://doi.org/10.1007/s11904-020-00537-8>
- Barbier F., Mer M., Szychowiak P., Miller R.F., Mariotte É., Galicier L., et al. Management of HIV-infected patients in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2020; 46(2): 329–42. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05945-3>
- Limper A.H., Adenis A., Le T., Harrison T.S. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(11): e334–43. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30303-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30303-1)
- José R.J., Periselneris J.N., Brown J.S. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. *Medicine (Abingdon)*. 2020; 48(6): 366–72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.03.006>
- Wielgos A.A., Pietrzak B. Human papilloma virus-related premalignant and malignant lesions of the cervix and anogenital tract in immunocompromised women. *Ginekol. Pol.* 2020; 91(1): 32–7. <https://doi.org/10.5603/GP.2020.0008>
- Cesarman E., Damania B., Krown S.E., Martin J., Bower M., Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2019; 5(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0060-9>
- Thandra K.C., Barsouk A., Saginala K., Padala S.A., Barsouk A., Rawla P. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Med. Sci. (Basel)*. 2021; 9(1): 5. <https://doi.org/10.3390/medsci9010005>
- Abram M.E., Ferris A.L., Shao W., Alvord W.G., Hughes S.H. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.* 2010; 84(19): 9864–78. <https://doi.org/10.1128/JVI.00915-10>
- Margolis A.M., Heverling H., Pham P.A., Stolbach A. A review of the toxicity of HIV medications. *J. Med. Toxicol.* 2014; 10(1): 26–39. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0325-8>
- Clutter D.S., Jordan M.R., Bertagnolio S., Shafer R.W. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 46: 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
- Качанов Д.А., Атангулов Г.И., Хамале Х., Лишкевич И.А., Елшаптири М.Н.Д., Иванян Ж.Н. и др. Особенности назначения антиретровирусных препаратов при лечении ВИЧ-инфицированных пациентов. *Международный научно-исследовательский журнал.* 2021; (2-3): 25–30. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.103.2.066>
- EPIVIR (lamivudine). Tablets and Oral Solution. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020564s031_020596s0301bl.pdf
- Johnson M.A., Verpooten G.A., Daniel M.J., Plumb R., Moss J., Van Caesbroeck D., et al. Single dose pharmacokinetics of lamivudine in subjects with impaired renal function and the effect of haemodialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46(1): 21–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00044.x>
- Manfredi R., Calza L. HIV infection and the pancreas: risk factors and potential management guidelines. *Int. J. STD AIDS.* 2008; 19(2): 99–105. <https://doi.org/10.1258/ijasa.2007.007076>
- Herlitz L.C., Mohan S., Stokes M.B., Radhakrishnan J., D'Agati V.D., Markowitz G.S. Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities. *Kidney Int.* 2010; 78(11): 1171–7. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.318>
- Abe K., Obara T., Kamio S., Kondo A., Imamura J., Goto T., et al. Renal function in Japanese HIV-1-positive patients who switch to tenofovir alafenamide fumarate after long-term tenofovir disoproxil fumarate: a single-center observational study. *AIDS Res. Ther.* 2021; 18(1): 94. <https://doi.org/10.1186/s12981-021-00420-5>
- Wessman M., Weis N., Katzenstein T.L., Lebeck A.M., Thorsteinsson K., Hansen A.E., et al. The significance of HIV to bone mineral density. *Ugeskr. Laeger.* 2017; 179(36): V05170420. (in Danish)
- Ruane P.J., DeJesus E., Berger D., Markowitz M., Bredeek U.F., Callebaut C., et al. Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of tenofovir alafenamide as 10-day monotherapy in HIV-1-positive adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2013; 63(4): 449–55. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182965d45>
- Bañó M., Morén C., Barroso S., Juárez D.L., Guitart-Mampel M., González-Casacuberta I., et al. Mitochondrial toxicogenomics for antiretroviral management: HIV post-exposure prophylaxis in uninfected patients. *Front. Genet.* 2020; 11: 497. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00497>
- Kinloch-De Loës S., Hirschel B.J., Hoen B., Cooper D.A., Tindall B., Carr A., et al. A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333(7): 408–13. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508173330702>
- Hachiya A., Kodama E.N., Schuckmann M.M., Kirby K.A., Michailidis E., Sakagami Y., et al. K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One.* 2011; 6(1): e16242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016242>
- Sarafianos S.G., Das K., Clark A.D.Jr., Ding J., Boyer P.L., Hughes S.H., et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999; 96(18): 10027–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10027>
- Marcelin A.G. Resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: Geretti A.M., ed. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. Chapter 1.* London: Mediscript; 2006.
- Rai M.A., Pannek S., Fichtenbaum C.J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection. *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 2018; 23(2): 149–57. <https://doi.org/10.1080/14728214.2018.1474202>
- Rihs T.A., Begley K., Smith D.E., Sarangapani J., Callaghan A., Kelly M., et al. Efavirenz and chronic neuropsychiatric symptoms: a cross-sectional case control study. *HIV Med.* 2006; 7(8): 544–8. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00419.x>
- Mollan K.R., Smurzynski M., Eron J.J., Daar E.S., Campbell T.B., Sax P.E., et al. Association between efavirenz as initial therapy for HIV-1 infection and increased risk for suicidal ideation or attempted or completed suicide: an analysis of trial data. *Ann. Intern. Med.* 2014; 161(1): 1–10. <https://doi.org/10.7326/M14-0293>
- Leutscher P.D., Stecher C., Storgaard M., Larsen C.S. Discontinuation of efavirenz therapy in HIV patients due to neuropsychiatric adverse effects. *Scand. J. Infect. Dis.* 2013; 45(8): 645–51. <https://doi.org/10.3109/00365548.2013.773067>
- Cohen C., Wohl D., Arribas J.R., Henry K., Van Lunzen J., Bloch M., et al. Week 48 results from a randomized clinical trial of rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate vs. efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve HIV-1-infected adults. *AIDS.* 2014; 28(7): 989–97. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000169>
- Hsiou Y., Das K., Ding J., Clark A.D.Jr., Kleim J.P., Rösner M., et al. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse

- transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBV 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J. Mol. Biol.* 1998; 284(2): 313–23. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2171>
38. Kertesz D.J., Brotherton-Pleiss C., Yang M., Wang Z., Lin X., Qiu Z., et al. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20(14): 4215–8. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.040>
 39. Betancor G., Álvarez M., Marcelli B., Andrés C., Martínez M.A., Menéndez-Arias L. Effects of HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations on polypurine tract removal and initiation of (+)-strand DNA synthesis. *Nucleic. Acids. Res.* 2015; 43(4): 2259–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv077>
 40. Kotler D.P. HIV and antiretroviral therapy: lipid abnormalities and associated cardiovascular risk in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008; 49(Suppl. 2): S79–85. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318186519c>
 41. Vyas A.K., Koster J.C., Tzekov A., Hruz P.W. Effects of the HIV protease inhibitor ritonavir on GLUT4 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(47): 36395–400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176321>
 42. Hardy W.D., Gulick R.M., Mayer H., Fätkenheuer G., Nelson M., Heera J., et al. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010; 55(5): 558–64. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ee3d82>
 43. Yuen M.F., Schiefke I., Yoon J.H., Ahn S.H., Heo J., Kim J.H., et al. RNA interference therapy with ARC-520 results in prolonged hepatitis B surface antigen response in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatology.* 2020; 72(1): 19–31. <https://doi.org/10.1002/hep.31008>
 44. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
 45. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
 46. Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>
 47. Page K.A., Liegler T., Feinberg M.B. Use of a green fluorescent protein as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1997 Sep 1; 13(13):1077–81. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1077>
 48. Novina C.D., Murray M.F., Dykxhoorn D.M., Beresford P.J., Riess J., Lee S.K., et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2002; 8(7): 681–6. <https://doi.org/10.1038/nm725>
 49. Coburn G.A., Cullen B.R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9225–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9225-9231.2002>
 50. Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori Y., Taku H. Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antivir. Chem. Chemother.* 2006; 17(5): 241–9. <https://doi.org/10.1177/095632020601700501>
 51. Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Gorbacheva M.A., Gashnikova N.M., Gashnikova M.P., Melnikova N.V., et al. Six highly conserved targets of RNAi revealed in HIV-1-infected patients from Russia are also present in many HIV-1 strains worldwide. *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* 2017; 8: 330–44. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.010>
 52. Aquaro S., Caliò R., Balzarini J., Bellocchi M.C., Garaci E., Perno C.F. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral. Res.* 2002; 55(2): 209–25. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00052-9](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00052-9)
 53. Trillo-Pazos G., Diamanturos A., Rislove L., Menza T., Chao W., Belem P., et al. Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol.* 2003; 13(2): 144–54. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00014.x>
 54. Dave R.S., Pomerantz R.J. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains. *J. Virol.* 2004; 78(24): 13687–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13687-13696.2004>
 55. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
 56. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science.* 2008; 319(5865): 921–6. <https://doi.org/10.1126/science.1152725>
 57. Rodriguez M., Lapierre J., Ojha C.R., Kaushik A., Batrakova E., Kashanchi F., et al. Intranasal drug delivery of small interfering RNA targeting Beclin1 encapsulated with polyethylenimine (PEI) in mouse brain to achieve HIV attenuation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1862. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01819-9>
 58. Capranico G., Tinelli S., Austin C.A., Fisher M.L., Zunino F. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1132(1): 43–8. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90050-a](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90050-a)
 59. Sunnam L.B.K., Kondapi A.K. Topoisomerase II β gene specific siRNA delivery by nanoparticles prepared with c-ter Apotransferrin and its effect on HIV-1 replication. *Mol. Biotechnol.* 2021; 63(8): 732–45. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00334-7>
 60. Wheeler L.A., Vrbanac V., Trifonova R., Brehm M.A., Gilboa-Geffen A., Tanno S., et al. Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras. *Mol. Ther.* 2013; 21(7): 1378–89. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.77>

REFERENCES

1. WHO. Fact sheet. HIV. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
3. Nyamweya S., Hegedus A., Jaye A., Rowland-Jones S., Flanagan K.L., Macallan D.C. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* 2013; 23(4): 221–40. <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
4. Spudich S.S., Ances B.M. Neurologic complications of HIV infection. *Top. Antivir. Med.* 2012; 20(2): 41–7.
5. Vachiat A., McCutcheon K., Tsabedze N., Zachariah D., Manga P. HIV and ischemic heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69(1): 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.979>
6. Kearns A., Gordon J., Burdo T.H., Qin X. HIV-1-associated atherosclerosis: unraveling the missing link. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69(25): 3084–98. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.012>
7. Ances B.M., Anderson A.M., Letendre S.L. Neurologic complications of HIV-1 infection or COVID-19. *Top. Antivir. Med.* 2021; 29(2): 334–43.
8. Heyns C.F., Groeneveld A.E., Sigarroa N.B. Urologic complications of HIV and AIDS. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2009; 6(1): 32–43. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1273>
9. Sim J.H., Mukerji S.S., Russo S.C., Lo J. Gastrointestinal dysfunction and HIV comorbidities. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2021; 18(1): 57–62. <https://doi.org/10.1007/s11904-020-00537-8>
10. Barbier F., Mer M., Szychowiak P., Miller R.F., Mariotte É., Galicier L., et al. Management of HIV-infected patients in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2020; 46(2): 329–42. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05945-3>
11. Limper A.H., Adenis A., Le T., Harrison T.S. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(11): e334–43. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30303-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30303-1)
12. José R.J., Periselneris J.N., Brown J.S. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. *Medicine (Abingdon).* 2020; 48(6): 366–72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.03.006>
13. Wielgos A.A., Pietrzak B. Human papilloma virus-related premalignant and malignant lesions of the cervix and anogenital tract in immunocompromised women. *Ginekol. Pol.* 2020; 91(1): 32–7. <https://doi.org/10.5603/GP.2020.0008>

REVIEWS

14. Cesarman E., Damania B., Krown S.E., Martin J., Bower M., Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019; 5(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0060-9>.
15. Thandra K.C., Barsouk A., Saginala K., Padala S.A., Barsouk A., Rawla P. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Med. Sci. (Basel)*. 2021; 9(1): 5. <https://doi.org/10.3390/medsci9010005>
16. Abram M.E., Ferris A.L., Shao W., Alvord W.G., Hughes S.H. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.* 2010; 84(19): 9864–78. <https://doi.org/10.1128/JVI.00915-10>
17. Margolis A.M., Heverling H., Pham P.A., Stolbach A. A review of the toxicity of HIV medications. *J. Med. Toxicol.* 2014; 10(1): 26–39. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0325-8>
18. Clutter D.S., Jordan M.R., Bertagnolio S., Shafer R.W. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 46: 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
19. Kachanov D.A., Atangulov G.I., Khamade Kh., Lishkevich I.A., Elshashtiri M.N.D., Ivanyan Zh.N., et al. Aspects of the prescribing antiretroviral drugs in the treatment of HIV-infected patients. *Mezh-dunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2021; (2-3): 25–30. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.103.2.066> (in Russian)
20. EPIVIR (lamivudine). Tablets and Oral Solution. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020564s031.020596s0301bl.pdf
21. Johnson M.A., Verpooten G.A., Daniel M.J., Plumb R., Moss J., Van Caesbroeck D., et al. Single dose pharmacokinetics of lamivudine in subjects with impaired renal function and the effect of haemodialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46(1): 21–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00044.x>
22. Manfredi R., Calza L. HIV infection and the pancreas: risk factors and potential management guidelines. *Int. J. STD AIDS*. 2008; 19(2): 99–105. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2007.007076>
23. Herlitz L.C., Mohan S., Stokes M.B., Radhakrishnan J., D'Agati V.D., Markowitz G.S. Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities. *Kidney Int.* 2010; 78(11): 1171–7. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.318>
24. Abe K., Obara T., Kamio S., Kondo A., Imamura J., Goto T., et al. Renal function in Japanese HIV-1-positive patients who switch to tenofovir alafenamide fumarate after long-term tenofovir disoproxil fumarate: a single-center observational study. *AIDS Res. Ther.* 2021; 18(1): 94. <https://doi.org/10.1186/s12981-021-00420-5>
25. Wessman M., Weis N., Katzenstein T.L., Lebech A.M., Thorsteins-son K., Hansen A.E., et al. The significance of HIV to bone mineral density. *Ugeskr. Laeger*. 2017; 179(36): V05170420. (in Danish)
26. Ruane P.J., DeJesus E., Berger D., Markowitz M., Bredeek U.F., Callebaut C., et al. Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of tenofovir alafenamide as 10-day monotherapy in HIV-1-positive adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2013; 63(4): 449–55. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182965d45>
27. Baño M., Morén C., Barroso S., Juárez D.L., Guitart-Mampel M., González-Casacuberta I., et al. Mitochondrial toxicogenomics for antiretroviral management: HIV post-exposure prophylaxis in uninfected patients. *Front. Genet.* 2020; 11: 497. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00497>
28. Kinloch-De Loës S., Hirschel B.J., Hoen B., Cooper D.A., Tindall B., Carr A., et al. A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333(7): 408–13. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508173330702>
29. Hachiya A., Kodama E.N., Schuckmann M.M., Kirby K.A., Michailidis E., Sakagami Y., et al. K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One*. 2011; 6(1): e16242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016242>
30. Sarafianos S.G., Das K., Clark A.D.Jr., Ding J., Boyer P.L., Hughes S.H., et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(18): 10027–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10027>
31. Marcelin A.G. Resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: Geretti A.M., ed. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. Chapter 1*. London: Mediscript; 2006.
32. Rai M.A., Pannek S., Fichtenbaum C.J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection. *Expert. Opin. Emerg. Drugs*. 2018; 23(2): 149–57. <https://doi.org/10.1080/14728214.2018.1474202>
33. Rihs T.A., Begley K., Smith D.E., Sarangapany J., Callaghan A., Kelly M., et al. Efavirenz and chronic neuropsychiatric symptoms: a cross-sectional case control study. *HIV Med.* 2006; 7(8): 544–8. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00419.x>
34. Mollan K.R., Smurzynski M., Eron J.J., Daar E.S., Campbell T.B., Sax P.E., et al. Association between efavirenz as initial therapy for HIV-1 infection and increased risk for suicidal ideation or attempted or completed suicide: an analysis of trial data. *Ann. Intern. Med.* 2014; 161(1): 1–10. <https://doi.org/10.7326/M14-0293>
35. Leutscher P.D., Stecher C., Storgaard M., Larsen C.S. Discontinuation of efavirenz therapy in HIV patients due to neuropsychiatric adverse effects. *Scand. J. Infect. Dis.* 2013; 45(8): 645–51. <https://doi.org/10.3109/00365548.2013.773067>
36. Cohen C., Wohl D., Arribas J.R., Henry K., Van Lunzen J., Bloch M., et al. Week 48 results from a randomized clinical trial of rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate vs. efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve HIV-1-infected adults. *AIDS*. 2014; 28(7): 989–97. <https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000169>
37. Hsiou Y., Das K., Ding J., Clark A.D.Jr., Kleim J.P., Rösner M., et al. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBV 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J. Mol. Biol.* 1998; 284(2): 313–23. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2171>
38. Kertesz D.J., Brotherton-Pleiss C., Yang M., Wang Z., Lin X., Qiu Z., et al. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20(14): 4215–8. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.040>
39. Betancor G., Álvarez M., Marcelli B., Andrés C., Martínez M.A., Menéndez-Arias L. Effects of HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations on polypurine tract removal and initiation of (+)-strand DNA synthesis. *Nucleic. Acids. Res.* 2015; 43(4): 2259–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv077>
40. Kotler D.P. HIV and antiretroviral therapy: lipid abnormalities and associated cardiovascular risk in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008; 49(Suppl. 2): S79–85. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318186519c>
41. Vyas A.K., Koster J.C., Tzekov A., Hruz P.W. Effects of the HIV protease inhibitor ritonavir on GLUT4 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(47): 36395–400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176321>
42. Hardy W.D., Gulick R.M., Mayer H., Fätkenheuer G., Nelson M., Heera J., et al. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010; 55(5): 558–64. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ee3d82>
43. Yuen M.F., Schiefke I., Yoon J.H., Ahn S.H., Heo J., Kim J.H., et al. RNA interference therapy with ARC-520 results in prolonged hepatitis B surface antigen response in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatology*. 2020; 72(1): 19–31. <https://doi.org/10.1002/hep.31008>
44. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
45. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
46. Pashkov E.A., Fayzuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190> (in Russian)
47. Page K.A., Liegler T., Feinberg M.B. Use of a green fluorescent protein as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997 Sep 1; 13(13): 1077–81. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1077>
48. Novina C.D., Murray M.F., Dykxhoorn D.M., Beresford P.J., Riess J., Lee S.K., et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2002; 8(7): 681–6. <https://doi.org/10.1038/nm725>
49. Coburn G.A., Cullen B.R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interfer-

- ence. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9225–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9225-9231.2002>
50. Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori Y., Takaku H. Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antivir. Chem. Chemother.* 2006; 17(5): 241–9. <https://doi.org/10.1177/095632020601700501>
 51. Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Gorbacheva M.A., Gashnikova N.M., Gashnikova M.P., Melnikova N.V., et al. Six highly conserved targets of RNAi revealed in HIV-1-infected patients from Russia are also present in many HIV-1 strains worldwide. *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* 2017; 8: 330–44. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.010>
 52. Aquaro S., Calìo R., Balzarini J., Bellocchi M.C., Garaci E., Perno C.F. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral. Res.* 2002; 55(2): 209–25. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00052-9](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00052-9)
 53. Trillo-Pazos G., Diamanturos A., Rislove L., Menza T., Chao W., Belem P., et al. Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol.* 2003; 13(2): 144–54. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00014.x>
 54. Dave R.S., Pomerantz R.J. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains. *J. Virol.* 2004; 78(24): 13687–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13687-13696.2004>
 55. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Rafferty M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
 56. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science.* 2008; 319(5865): 921–6. <https://doi.org/10.1126/science.1152725>
 57. Rodriguez M., Lapierre J., Ojha C.R., Kaushik A., Batrakova E., Kashanchi F., et al. Intranasal drug delivery of small interfering RNA targeting Beclin1 encapsulated with polyethylenimine (PEI) in mouse brain to achieve HIV attenuation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1862. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01819-9>
 58. Capranico G., Tinelli S., Austin C.A., Fisher M.L., Zunino F. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1132(1): 43–8. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90050-a](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90050-a)
 59. Sunnam L.B.K., Kondapi A.K. Topoisomerase II β gene specific siRNA delivery by nanoparticles prepared with c-ter Apotransferrin and its effect on HIV-1 replication. *Mol. Biotechnol.* 2021; 63(8): 732–45. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00334-7>
 60. Wheeler L.A., Vrbanac V., Trifonova R., Brehm M.A., Gilboa-Geffen A., Tanno S., et al. Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras. *Mol. Ther.* 2013; 21(7): 1378–89. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.77>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-112>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Альтернативные подходы к диагностике африканской чумы свиней на территории Российской Федерации в 2017–2021 гг.

Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Шевченко И.В., Елсукова А.А., Аронова Е.В., Власова Н.Н.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, Россия

Введение. В рамках борьбы с африканской чумой свиней (АЧС) на территории Российской Федерации проводятся мониторинговые исследования проб от свиней и кабанов. В ходе рутинной серологической диагностики специфические антитела к вирусу выявляют лишь в единичных образцах. При этом известно об обнаружении на территории России и сопредельных стран изолятов АЧС с ослабленной вирулентностью.

Целью данной работы являлись определение возможности использования альтернативных проб и оценка эффективности используемых методов диагностики АЧС у восприимчивых животных на территории РФ.

Материалы и методы. В работе использовали биоматериал, полученный в полевых условиях и от экспериментально инфицированных животных.

Результаты. Показано, что комплексное тестирование (ПЦР-РВ и ТФ-ИФА) является более эффективным способом диагностики хронической и бессимптомной формы АЧС, чем их раздельное использование. продемонстрирована возможность и эффективность использования альтернативных образцов в диагностике. Подтверждена высокая диагностическая чувствительность иммунопероксидазного метода, его способность выявлять антитела на более ранних, чем ТФ-ИФА, сроках и возможность использования расширенного спектра проб. Антитела к вирусу АЧС выявлены у домашних и диких свиней в пяти федеральных округах РФ. Установлено, что в пробах от инфицированных свиней, отрицательных в ПЦР-РВ, могут быть выявлены специфические антитела к вирусу АЧС при их серологическом исследовании. Наличие генома в образцах суставных тканей указывает на возможность животных с хронической и бессимптомной формой течения болезни выступать переносчиками инфекции. Обнаружение антител в пробах от отстрелянных кабанов (отрицательных или сомнительных в ПЦР-РВ) предполагает существование животных, выживших после инфицирования АЧС.

Заключение. Полученные данные требуют пересмотра стратегии надзора за АЧС, внедрения комплексных методов диагностики, направленных на параллельное обнаружение генома и антител и допускающих исследование образцов, альтернативных сыворотке, для обнаружения антител и (или) отбора и направления образцов сыворотки крови, в том числе от кабанов.

Ключевые слова: африканская чума свиней; серологическая диагностика; иммунопероксидазный анализ; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; эпизоотология

Для цитирования: Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Шевченко И.В., Елсукова А.А., Аронова Е.В., Власова Н.Н. Альтернативные подходы к диагностике африканской чумы свиней на территории Российской Федерации в 2017–2021 гг. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(4): 290-303. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-112>

Для корреспонденции: Шотин Андрей Романович, младший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, Россия. E-mail: shotin@arriah.ru

Участие авторов: Шотин А.Р. – концепция и дизайн исследования; Шотин А.Р., Мазлум А., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Шевченко И.В., Елсукова А.А. – лабораторное исследование; Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С. – сбор и обработка материала; Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Шевченко И.В. – написание текста; Иголкин А.С., Мазлум А., Аронова Е.В., Власова Н.Н. – редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках тематики НИР «Проведение прикладных научных исследований за 2020–2021 гг.».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол б/н от 30.04.2020 г.).

Поступила 27.06.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-112>

Alternative approaches to the diagnosis of African swine fever in the Russian Federation in 2017–2021

Andrey R. Shotin, Ali Mazloun, Alexey S. Igolkin, Ivan V. Shevchenko, Alexandra A. Elsukova, Elena V. Aronova, Natalia N. Vlasova

FGBI “Federal Centre for Animal Health”, 600901, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia

Introduction. Prevention and control of African swine fever (ASF) transmission on the territory of the Russian Federation requires monitoring based on testing of samples from pigs and wild boars. Specific anti-ASFV antibodies are rarely detected in samples during routine serological diagnostics. Although, ASF isolates with weakened virulence were confirmed in Russia and neighboring countries.

The aim of this work was to determine the possibility of using alternative samples for ASF diagnosis and evaluate the effectiveness of the diagnostic methods used on the territory of Russia.

Materials and methods. Biological materials obtained from experimentally infected animals and samples collected in the “field” conditions were used in this study.

Results. Complex testing (RT-PCR and ELISA) is a more effective approach to diagnose chronic and asymptomatic forms of ASF compared to the separate use of these techniques. The possibility and efficiency of using alternative samples in diagnostics are demonstrated. It was confirmed that IPT method overcomes ELISA by high diagnostic sensitivity and detection of antibodies on earlier stages in extended range of samples. Anti-ASFV antibodies were detected in domestic and wild pigs in five regions of Russia. Samples from infected pigs that are negative in RT-PCR can be positive for anti-ASFV antibodies. The detection of antibodies in samples from shot wild boars (negative or uncertain in RT-PCR test) suggests the existence of animals surviving ASF infection.

Conclusion. The data obtained suggest a revision of the ASF surveillance strategy, by introducing complex diagnostic methods aimed at detection of both the virus genome and anti-ASFV antibodies simultaneously.

Keywords: African swine fever; serological diagnosis; immunoperoxidase analysis; enzyme-linked immunosorbent assay; polymerase chain reaction; epidemiology

For citation: Shotin A.R., Mazloun A., Igolkin A.S., Shevchenko I.V., Elsukova A.A., Aronova E.V., Vlasova N.N. Alternative approaches to the diagnosis of African swine fever in the Russian Federation in 2017–2021. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 290–303 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-112>

For correspondence: Shotin A.R., Junior Researcher, FGBI “Federal Centre for Animal Health”, 600901, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia. E-mail: shotin@arria.ru

Information about the authors:

Shotin A.R., <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Mazloun A., <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Shevchenko I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>

Elsukova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4524-4941>

Aronova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>

Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

Contribution: Shotin A.R. – research concept and design; Shotin A.R., Mazloun A., Vlasova N.N., Aronova E.V., Shevchenko I.V., Elsukova A.A. – performing of the laboratory research; Shotin A.R., Mazloun A., Igolkin A.S. – collection and processing of the material; Shotin A.R., Mazloun A., Igolkin A.S., Shevchenko I.V. – writing of the text; Igolkin A.S., Mazloun A., Aronova E.V., Vlasova N.N. – editing of the article.

Funding. This study was carried out within the scope of research work “Conducting applied scientific research for 2020–2021.”

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the FGBI “Federal Centre for Animal Health” (protocol without number dated 30.04.2020).

Received 27 June 2022

Accepted 11 August 2022

Published 31 August 2022

Введение

Африканская чума свиней (*Pestis africana suum*, АЧС) – контагиозная септическая болезнь домашних,

в том числе декоративных, свиней и диких кабанов всех возрастов и пород [1–3]. Резервуарами вируса являются бородавочники, кустарниковые, дикие свиньи и клещи рода *Ornithodoros* [4].

Возбудитель АЧС – арбовирус, содержащий двухцепочную дезоксирибонуклеиновую кислоту и отнесённый к отдельному семейству *Asfarviridae*. У чувствительных животных болезнь протекает от сверхострой до бессимптомной формы [5, 6].

В первичных очагах на неэндемичных территориях преобладает острая форма болезни, характеризующаяся коротким инкубационным (2–6 суток) и клиническим (1–5 суток) периодом со смертностью среди восприимчивых животных, близкой к 100%. В эндемичных областях возможно появление и увеличение числа подострых, хронических и субклинических инфекций со снижением смертности, связанные с циркуляцией изолятов вируса со средней и низкой вирулентностью. В этих случаях инфекция может распространяться за счёт того, что в организме инфицированных животных возбудитель болезни присутствует в течение нескольких месяцев, не вызывая каких-либо характерных симптомов, за исключением перемежающейся лихорадки, задержки роста и (или) истощения, являющихся общими (сходными) для целого ряда других болезней, таких как классическая чума свиней, респираторно-репродуктивный синдром, рожа и др. Гибель животных наступает преимущественно в течение нескольких недель после инфицирования, однако часть может выздороветь или остаться субклинически инфицированными в течение неопределённого периода времени [7–12].

С момента заноса в 2007 г. и по настоящий день на территориях РФ и Евразии циркулирует вирус АЧС II генотипа. Сегодня имеются противоречивые данные о роли выживших животных в распространении инфекции. Так, в работах P.L. Eblé и соавт. (2019) и С. Gallardo и соавт. (2015) зарегистрирована передача вируса от переболевших животных контактным [10, 13]. Однако противоположный результат получен в экспериментах I. Nurmoja и соавт. и С. Gallardo и соавт. (2018), где передача вируса выжившими после инфицирования животными контактным отсутствовала. Тем не менее в последней работе у одного из четырех поросят отмечались эпизодические лёгкие клинические признаки болезни и короткая виремия. Следовательно, несмотря на высокий уровень смертности от вируса АЧС II генотипа, широко распространённого за пределами Африканского континента и острова Сардиния (Италия), возможно существование как выживших после переболевания свиней, так и клинически здоровых носителей вируса, способных являться источником возбудителя АЧС [14, 15].

Полевые и экспериментальные данные, полученные в Европе, показывают, что большая часть инфицированных животных умирает до формирования у них защитного иммунитета. Выявление серопозитивных животных (дикие кабаны), которые ранее в вирусологических тестах были диагностированы как положительные по АЧС, либо на пределе их обнаружения, либо отрицательные, свидетельствует о возможности выживания и (или) выздоровления восприимчивых животных после инфекции. При этом возможность последних оставаться носителями вируса обуслов-

ливает риск становления эндемичных зон по АЧС и дальнейшего распространения болезни на новые территории [9, 15].

В Российской Федерации эпизоотия в период с 2016 по 2019 г. имела тренд на снижение количества вспышек, однако на данный момент общая ситуация остаётся напряжённой с вовлечением новых регионов и реинтродукцией возбудителя на оздоровлённые территории [16, 17]. Так, за 2021 г. в РФ официально notified 268 случаев инфекции, в том числе 174 среди домашних свиней и 91 в популяции дикого кабана (по состоянию на 31.12.2021 г.) [18].

В РФ ведущим фактором, способствующим широкому распространению вируса АЧС между регионами страны, являются факты нелегального перемещения инфицированных животных и продукции свиноводства. В случае присутствия и (или) заноса вируса в популяцию дикого кабана эпизоотическая ситуация неблагополучной зоны, как правило, приобретает эндемичный характер и способствует диффузному распространению инфекции как внутри популяции, так и за её пределы [19].

Выбор методов лабораторной диагностики АЧС зависит от эпизоотической ситуации и оснащённости лабораторий. Для обнаружения и идентификации возбудителя Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР), вирусыведение и реакцию прямой иммунофлуоресценции (РПИФ), а для выявления антител – твёрдофазный иммуноферментный анализ (ГФ-ИФА), реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), иммуноблоттинг (ИБ) и иммунопероксидазный метод (ИПМ) [20, 21].

При этом выявление всех вспышек (острые, подострые и хронические случаи) с наибольшей точностью и достоверностью возможно исключительно при использовании комплекса вирусологических и серологических методов [9, 10, 22].

Положительный результат на наличие возбудителя или его генома указывает на то, что во время отбора проб тестируемое животное находилось в активной фазе болезни после инфицирования. Одновременное обнаружение возбудителя или его генома и специфических антител к нему указывает на протекающую инфекцию (в том числе возможно хроническую или бессимптомную форму), длящуюся достаточное время для того, чтобы у животного выработались антитела в детектируемых количествах (не менее 7–14 суток в зависимости от животного и метода обнаружения). Обнаружение только специфических антител может указывать на переболевшее АЧС животное. В связи с этим для достижения цели повышения эффективности программ контроля и искоренения инфекции необходимо обладать достоверной информацией по эпизоотической ситуации АЧС на изучаемой территории, что невозможно без совместного применения вирусологических и серологических методов диагностики [15, 23, 24].

При подозрении на АЧС в дополнение к стандартно отбираемым органам (селезёнка, лимфатические

Таблица 1. Количество и вид полевых образцов, использованных в работе

Table 1. Number and type of field samples used in the study

Происхождение Source	Биологический материал Biological materials	Продукция свиноводства Pig products	Сыворотка крови Blood serum	Цельная кровь Whole blood	Всего Total
Кабаны Wild boars	Отстрел Hunted	4	—	3	440
	Падёж Dead	—	—	—	71
Свиньи* Domestic pigs*		21	63	19	186
Всего Total		25	63	22	697

Примечание. *Пробы продукции свиноводства получены от убитых свиней; сыворотка и цельная кровь отобраны прижизненно; пробы биологического материала от свиней не разделялись на категории павших и убитых.

Note. *Samples of pig products were obtained from slaughtered pigs; serum and whole blood were taken from live pigs; samples of biological material were not divided into categories of dead and slaughter.

узлы, почки, лёгкие и костный мозг) следует направлять и образцы сыворотки крови для серологического тестирования [12, 25].

ТФ-ИФА является наиболее часто используемым тестом для рутинной диагностики специфических антител к АЧС в сыворотках крови восприимчивых животных, однако его применение имеет ряд ограничений, связанных с недостаточной чувствительностью метода в случае исследования проб сыворотки крови, полученных в ранние дни после заражения (д.п.з.), так как при его использовании детектирование антител возможно начиная с 12–14-го д.п.з. Ввиду низкой точности при исследовании тканевых экссудатов (специфичность около 80%) метод ТФ-ИФА имеет узкий спектр проб для исследования – в основном это сыворотка крови. Кроме того, положительный результат в ТФ-ИФА требует подтверждения с помощью методов ИБ, ИПМ и (или) РНИФ [9, 15, 22, 24].

Использование метода ИБ возможно для исследования проб сыворотки и гомогенатов тканей, однако реакция плохо масштабируется: она требует наибольших затрат времени на пробоподготовку и проведение исследования, целесообразна лишь при исследовании небольшого числа проб, не превышающего нескольких десятков. При исследовании образцов из районов, где присутствуют хронически инфицированные животные, может быть получена недостоверная картина, затрудняющая интерпретацию результатов. В последнем случае потребуется проведение тестирования альтернативными подтверждающими серологическими методами диагностики, такими как РНИФ и (или) ИПМ [12, 23, 26].

ИПМ превосходит ТФ-ИФА по чувствительности и специфичности при исследовании образцов сыворотки крови. Кроме того, ИПМ позволяет исследовать не только сыворотки, но и пробы крови, экссудата и тканей, а также способен выявлять специфические антитела на более ранних сроках, чем ТФ-ИФА. Ввиду вышесказанного ИПМ является лучшим тестом для серологической диагностики АЧС [9, 15, 22–24].

Сообщения об обнаружении изолятов вируса АЧС со сниженной вирулентностью на территории как РФ,

так и сопредельных стран усложняет раннюю диагностику АЧС и создаёт новые вызовы в борьбе с болезнью [14, 27–30].

В данной статье представлены результаты анализа данных, полученных в ходе обнаружения специфических антител к вирусу АЧС в пробах в период с 2017 по 2021 г. на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

Полевые образцы отобраны в соответствии с «Правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования»¹. Всего исследовано 775 образцов, в том числе 78 проб, полученных ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» («ВНИИЗЖ») в рамках научно-исследовательской работы (НИР), и 697 проб – в рамках государственного задания «Эпизоотический мониторинг» (ЭМ). Образцы для ЭМ были отобраны от домашних свиней и диких кабанов всех возрастов из 27 регионов РФ за период 2017–2021 гг. и включали 587 проб биологического материала (селезёнка, костный мозг и др.), 25 – продукции свиноводства (полуфабрикаты (свинина и кабанье мясо) и субпродукты), 63 пробы сыворотки крови и 22 пробы цельной крови (табл. 1).

Большая часть полевых проб представляла собой образцы, отобранные в 2021 г. (618 проб), в то время как период 2017–2020 гг. представлен 79 пробами.

Экспериментальные образцы. В рамках НИР по изучению биологических свойств адаптированного вируса АЧС штамм *ASF/ARRIAH/CV-1/60* в условиях виварного комплекса ФГБУ «ВНИИЗЖ» проведено заражение 12 поросят крупной белой породы массой 15–20 кг. У животных произведён отбор проб крови на 0, 12, 18, 25 и 32-й д.п.з. с последующим разделением на сгусток и сыворотку. На 35-й д.п.з. произведён убой

¹«Правила взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования» (утв. Минсельхозом СССР 24.06.1971) // Ветеринарное законодательство. М.: Колос, 1972. Т. II.

двух подопытных животных с признаками хронической формы течения АЧС: опухание суставов, перемежающаяся лихорадка и кратковременная (до 18–25 д.п.з.) вирусемия с последующим патолого-анатомическим вскрытием и отбором проб тканей и органов (лимфоузлы, печень, почка, селезёнка, лёгкие, мышечная ткань и ткани поражённых суставов). Таким образом, для исследований отобрано 60 образцов крови (разделённая на сгусток и сыворотку) и 18 проб органов и тканей.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол б/н от 30.04.2020).

Обнаружение антител к вирусу АЧС проводили с использованием ТФ-ИФА с помощью коммерческой тест-системы Ingezim PPA Compac (Ingenasa, Испания) в соответствии с инструкцией производителя² и иммунопероксидазным методом (используется как референтный метод при проведении серологической диагностики на АЧС) [21], согласно «Методическим рекомендациям по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней иммунопероксидазным методом» (разработчик ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир)³.

С целью обнаружения антител в тканях инфицированных животных использовали супернатанты (надосадочную жидкость), полученные путём изготовления 10% тканевых гомогенатов при добавлении 0,85% NaCl последующей двукратной заморозкой при $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ и центрифугированием при 850 g в течение 30 мин.

Сыворотку крови перед исследованием осветляли центрифугированием при 850 g в течение 10 мин.

Пробы крови использовали без предварительной подготовки.

Пробы мясного сока получали путём двукратного цикла заморозки – оттаивания цельных образцов при $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ с последующим отбором образовавшейся жидкости и её центрифугированием при 850 g в течение 10 мин.

Обнаружение генома вируса АЧС проводили с помощью тест-системы «АЧС» для выявления вируса АЧС методом полимеразной цепной реакции (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно прилагаемой инструкции⁴,

а также в соответствии с «Методическими указаниями по выявлению генома вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (разработчик ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир)⁵.

Выделение вируса АЧС проводили согласно «Методическим рекомендациям по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезёнки свиней» (разработчик ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир)⁶.

Результаты

В результате экспериментального заражения свиней установлено, что адаптированный вариант вируса АЧС ASF/ARRIAH/CV-1/60 вызывает хроническую или бессимптомную форму течения болезни. У животных в ходе эксперимента наблюдались перемежающаяся лихорадка, опухание суставов конечностей и кратковременная (до 12–32 д.п.з.) вирусемия. Результаты исследования проб крови от экспериментально заражённых животных с помощью методов ПЦР-РВ (в реальном времени), ИПМ и ТФ-ИФА представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, специфические антитела к вирусу АЧС детектировали в пробах крови всех заражённых животных начиная с 12-го д.п.з. в ИПМ и только с 32-го д.п.з. в ТФ-ИФА. Доля проб, содержащих геном вируса АЧС, уменьшалась на протяжении эксперимента: так, на 12-й д.п.з. положительными в ПЦР-РВ являлись 67% заражённых животных, а к 32-му д.п.з. все животные имели негативный статус по наличию генома возбудителя в крови. Использование комбинации ПЦР-РВ и ТФ-ИФА в течение эксперимента показало большую долю обнаружения инфицированных животных, чем использование только одного из них.

Образцы органов от двух убитых свиней, имеющих клинические признаки хронической формы АЧС (опухание суставов конечностей), отрицательные по наличию генома возбудителя АЧС в крови на 35-й д.п.з. исследовали параллельно на наличие генома вируса и специфических антител к нему методами ПЦР-РВ и ИПМ.

Геном вируса АЧС детектировали исключительно при исследовании проб суставных тканей от двух убитых животных № 1 и 2 ($Ct = 14,57$ и $18,13$ соответственно), сомнительный результат ($Ct = 26,45$) получен при исследовании мышечной ткани свиньи № 1. Образец считали положительным при величине Ct менее 20, сомнительным – от 20 до 35, отрицательным – при отсутствии значений Ct . При параллельном исследовании в ИПМ во всех 18 исследованных

²Blocking Immunoenzymatic assay for detection of antibodies to African Swine Fever virus (ASFV) in porcine serum. Ingezim PPA COMPAC. Prod Ref: 11.PPA.K3. Last revision: 18-12-18. Ingenasa, Madrid, Spain.

³Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней иммунопероксидазным методом / А.С. Першин, Т.Н. Комова, А.Р. Шотин [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2020. 12 с.

⁴Инструкция по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (обновление от 18.06.2019) Режим доступа: https://interlab-service.ru/upload/iblock/f5d/%D0%90%D0%A7%D0%A1_%D0%90%D0%95_180619.pdf (дата обращения: 12.01.2021).

⁵Методические указания по выявлению генома вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: утв. Россельхознадзором. 2017. 13 с.

⁶Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезёнки свиней / А. Мазлум, Д.В. Шарыпова, В.Л. Гаврилова, [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2019. 24 с.

Таблица 2. Результаты исследования проб крови с помощью методов ПЦР-РВ, ИПМ и ТФ-ИФА

Table 2. Results of the blood samples testing using real-time PCR, IPT and ELISA methods

День после заражения days post-infection	Доля положительных результатов (%) Percent of positive results (%)			
	ПЦР-РВ Real-time PCR	ИПМ IPT	ТФ-ИФА ELISA	Параллельное тестирование в ПЦР-РВ и ТФ-ИФА Simultaneous testing in real-time PCR and ELISA
0	0	0	0	0
12	67	100	42	75
18	50	100	58	83
25	33	100	67	67
32	0	100	100	100
За всё время During the whole experiment	37	100	67	79

Примечание. Сомнительные результаты интерпретировали как положительные ввиду известного статуса животных; отсутствие положительных результатов на 0-й д.п.з. говорит об отсутствии контакта животных с вирусом АЧС до момента начала опыта и не учитывалось при заполнении графы таблицы «За всё время».

Note. Uncertain results were interpreted as positive due to the known status of the animals; no positive results at 0 dpi indicates that the animals did not have contact with ASF virus before the start of the experiment and was not taken into account when filling out the table column “During the whole experiment”.

Таблица 3. Результаты исследования проб от домашних свиней с помощью методов ПЦР-РВ, ИПМ и ТФ-ИФА

Table 3. The results of the testing of samples from domestic pigs using real-time PCR, IPT and ELISA methods

Вид пробы Sample type	Исследовано проб (n) Tested samples (n)	Метод исследования		
		ПЦР-РВ, количество положительных (n (%)) Real-time PCR Positive results (n (%))	ИПМ, количество положительных (n (%)) IPT Positive results (n (%))	ТФ-ИФА, количество положительных/сомнительных (n (%)) ELISA Positive/uncertain results (n (%))
Сыворотка Serum	63	55 (87,3)	50 (79,4)	4 (6,4) / 5 (8)
Кровь Blood	19	19 (100)	6 (31,6)	0 (0) / 0 (0)
Биологический материал Biological material	83	72 (86,8)	27 (32,5)	0 (0) / 0 (0)
Продукция свиноводства Pig products	21	7 (33,3)	3 (14,3)	0 (0) / 0 (0)
Всего Total	186	153 (82,3)	86 (46,2)	4 (6,4) / 5 (8)

Примечание. При исследовании всех положительных в ИПМ и ТФ-ИФА образцов методом ПЦР-РВ получен положительный результат.

Note. All samples positive in IPT and ELISA were tested positive in real-time PCR.

пробах тканей обнаружили специфические антитела к возбудителю АЧС.

При исследовании полевых образцов сывороток крови от домашних свиней, полученных в 2020–2021 гг. референтной лабораторией по АЧС при реализации государственного задания ЭМ и проведении референтных испытаний, в 153 пробах обнаружили геном вируса АЧС, а в 86 – специфические антитела к возбудителю болезни. Результаты представлены в **табл. 3**.

Как видно из **табл. 3**, геном возбудителя и специфические антитела к вирусу АЧС детектировали во всех группах образцов. При этом геном виру-

са АЧС выявляли во всех *положительных в ИПМ и ТФ-ИФА образцах*. Данные пробы отобраны в период с 2020 по 2021 г. в 5 федеральных округах РФ (**табл. 4**).

Как видно из **табл. 3** и **4**, в образцах сыворотки крови, отобранной в 2021 г. в двух свиноводческих комплексах (СК) Тамбовской области (5 и 50 проб), выявлен как геном (55 проб), так и специфические антитела к вирусу АЧС (50 проб). В то же время при исследовании 5 проб сыворотки в ТФ-ИФА получены сомнительные результаты, а при их тестировании в ИПМ – положительные. Также при случайной вы-

Таблица 4. Обнаружение генома вируса АЧС и специфических антител к нему в образцах от свиней, отобранных в 2020–2021 гг.
Table 4. Detection of the ASF virus genome and specific antibodies to this virus in samples from pigs collected in 2020–2021

Федеральный округ Federal district	Регион Region	Сыворотка Serum		Кровь Blood		Продукция свиноводства Pig products		Прочий биологический материал Other biological material		Всего Total	
		Геном Genome	АТ Ab.	Геном Genome	АТ Ab.	Геном Genome	АТ Ab.	Геном Genome	АТ Ab.	Геном Genome	АТ Ab.
Центральный Central	Владимирская область Vladimir	—	—	—	—	2	0	31	6	33	6
	Воронежская область Voronezh	—	—	—	—	—	—	5	1	5	1
	Курская область Kursk	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1
	Тамбовская область Tambov	55	50	8	5	—	—	2	—	65	55
	Тверская область Tver	—	—	—	—	3*	1*	—	—	3	1
	Ярославская область Yaroslavl	—	—	—	—	2	2	8	4	10	6
	Всего Total	55	50	8	5	7	3	47	12	117	70
Северо-Западный North-West	Республика Коми Republic of Komi	—	—	—	—	—	—	8	6	8	6
Южный South	Волгоградская область Volgograd	—	—	8	1	—	—	4	—	12	1
Приволжский Volga	Нижегородская область Nizhigorodskaya	—	—	—	—	—	—	2	—	2	0
	Забайкальский край Zabaykali	—	—	—	—	—	—	2	1	2	1
Дальневосточный Far east	Магаданская область Magadan	—	—	—	—	—	—	2	2	2	2
	Приморский край Primoriya	—	—	—	—	—	—	7	6	10	6
	Всего Total	0	0	3	0	0	0	11	9	14	9
Итого Total		55	50	19	6	7	3	72	27	153	86

Примечание. АТ – антитела. *Пробы отобраны в 2020 г.; остальные пробы отобраны в 2021 г. Прочий биологический материал – образцы проб органов (селезёнка, лимфатические узлы, костный мозг и др.).

Note. Ab. – antibodies; *Samples collected in 2020; the remaining samples were collected in 2021. Other biological material – samples of organs (spleen, lymph nodes, bone marrow, etc.).

борке исследовано 5 проб на наличие вируса АЧС, получен положительный результат.

В результате исследований проб крови, отобранных на территории 3 регионов (Приморский край, Волгоградская и Тамбовская области, 2021 г.), специфические антитела обнаружены в 6 образцах (СК Тамбовской области и личные подсобные хозяйства (ЛПХ) Волгоградской области) при использовании ИПМ, при тестировании 2 образцов обнаружен вирус АЧС.

При тестировании методом ПЦР-РВ 7 проб свинины, отобранных в Тверской (2020 г.), Владимирской (2021 г.) и Ярославской (2021 г.) областях, обнаружен геном вируса АЧС. При этом в одной пробе свинины из Тверской области обнаружены специфические антитела, а в двух пробах (1 образец свинины и 1 – субпродуктов) из Ярославской области – антитела и вирус АЧС.

Положительные на геном вируса АЧС пробы биологического материала отобраны на территории 11 регионов. Большая часть проб (31) отобрана на территории четырех ЛПХ двух районов Владимирской области. При этом антитела обнаружили у свиней в 3 хозяйствах. Также антитела детектировали у свиней в ЛПХ Забайкальского и Приморского краёв, Магаданской и Ярославской областей, в пробах от трупов свиней (владелец не установлен), обнаруженных на территориях Курской области и Приморского края.

При исследовании полевых образцов, отобранных от диких кабанов, полученных в 2017–2021 гг. референтной лабораторией по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» при реализации ЭМ и референтных (подтверждающих) исследований, в 110 пробах обнаружили геном вируса АЧС, при исследовании 5 проб методом ПЦР-РВ получили сомнительный результат, а в 29 детектировали наличие специфических антител к вирусу АЧС. Результаты представлены в табл. 5.

Как видно из табл. 5, геном вируса АЧС регистрировали во всех группах образцов, за исключением проб крови. Специфические антитела детектировали исключительно в группах прочего биологического материала. При этом во всех образцах от павших кабанов обнаружили геном вируса АЧС и в 16 (22,5%) пробах специфические антитела. В 39 (8,9%) и 5 (1,14%) образцах от отстрелянных животных при исследовании методом ПЦР-РВ получили положительные и сомнительные результаты соответственно, а при исследовании 13 (3%) образцов выявили специфические антитела. Однако при сводной оценке положительных результатов были интерпретированы как положительные уже 45 (10,2%) образцов.

В табл. 6 представлена информация об обнаружении генома и специфических антител в пробах, отобранных от отстрелянных и павших кабанов

Таблица 5. Результаты исследования проб от кабанов методами ПЦР-РВ и ИПМ

Table 5. Results of the testing of samples from wild boars by real-time PCR and IPT

Вид пробы Sample type		Результаты Results			
Отстрел/ падеж Hunted/ Dead	Вид материала Sample type	Исследовано (n) Tested (n)	ПЦР-РВ, количество положительных/ сомнительных (n (%)) Real-time PCR Positive/doubtful (n (%))	ИПМ, количество положительных (n (%)) IPT Positive (n (%))	Параллельное тестирование (ПЦР-РВ + ИПМ), количество положитель- ных/сомнительных (n (%)) Simultaneous testing (real-time PCR and IPT) Positive/uncertain (n (%))
	Кровь Blood	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Отстрел Hunted	Прочий биологический материал Other biological material	433	36 (8,3) / 5 (1,15)	13 (3)	42 (9,7) / 4 (0,92)
	Полуфабрикаты Semi manufactured products	4	3 (75) / 0 (0)	0 (0)	3 (75) / 0 (0)
	Всего Total	440	39 (8,9) / 5 (1,14)	13 (3)	45 (10,2) / 4 (0,91)
Павшие Dead	Прочий биологический материал Other Biological materials	71	71 (100) / 0 (0)	16 (22,5)	71 (100) / 0 (0)
	Всего отстрелянных и павших Total dead and hunted	511	110 (21,5) / 5 (0,98)	29 (5,3)	116 (22,7) / 4 (0,78)

Примечание. Прочий биологический материал – образцы проб органов (селезёнка, лимфатические узлы, костный мозг и др.).

Note. Other biological material – organ samples (spleen, lymph nodes, bone marrow, etc.).

Таблица 6. Обнаружение генома вируса АЧС и специфических антител к нему в образцах от кабанов, отобранных в 2017–2021 гг.
Table 6. Detection of the ASF virus genome and specific antibodies to this virus in samples from wild boars collected in 2017–2021

Федеральный округ Federal district	Регион Region	2017		2018		2020		2021		Всего	
		Геном Genome Отстрел/ падёж Hunted/ dead	АТ Ab. Отстрел/ падёж Hunted/ dead	Геном Genome Отстрел/ падёж Hunted/ dead	АТ Ab. Отстрел/ падёж Hunted/ dead	Геном Genome Отстрел/ падёж Hunted/ dead	АТ Ab. Отстрел/ падёж Hunted/ dead	Геном Genome Отстрел/ падёж Hunted/ dead	АТ Ab. Отстрел/ падёж Hunted/ dead	Геном Genome Отстрел/ падёж Hunted/dead	АТ Ab. Отстрел/ падёж Hunted/ dead
	Владимирская область Vladimir	1 (1*) / 0	2 / 0	1 / 0	3 / 0	–	–	0 / 0	1 / 0	2 (1*) / 0	6 / 0
Центральный Central	Калужская область Kaluga	–	–	–	–	–	–	1 / 0	0 / 0	1 / 0	0 / 0
	Ярославская область Yaroslavl	–	–	–	–	–	–	6 / 8	0 / 2	6 / 8	0 / 2
Северо-Западный North-West	Калининградская область Kaliningrad	1 / 2	1 / 0	1 / 0	0 / 0	–	–	–	–	2 / 2	1 / 0
	Волгоградская область Volgograd	–	–	–	–	1 / 0	1 / 0	2 / 0	0 / 0	3 / 0	1 / 0
Южный South	Ростовская область Rostov	–	–	–	–	–	–	0 / 12	0 / 1	0 / 12	0 / 1
	Республика Крым Crimea	–	–	0 / 5	0 / 2	–	–	–	–	0 / 5	0 / 2
Приволжский Volga	Саратовская область Saratov	–	–	–	–	–	–	0 / 7	0 / 1	0 / 7	0 / 1
	Республика Татарстан Republic of Tatarstan	–	–	–	–	4 (4**) / 0	3 / 0	7 / 1	0 / 0	11 (4**) / 1	3 / 0
Дальневосточный Far east	Приморский край Primoriya	–	–	–	–	–	–	5 / 18	0 / 8	5 / 18	0 / 8
	Хабаровский край Khabarovsk	–	–	–	–	–	–	9 / 18	2 / 2	9 / 18	2 / 2
Итого Total		2 (1) / 2	3 / 0	2 / 5	3 / 2	5 (4) / 0	4 / 0	30 / 64	3 / 14	39 (1*, 4**) / 71	13 / 16

Примечание. В скобках отмечено количество сомнительных результатов. *При исследовании методом вирусывыделения получен отрицательный результат. **При исследовании методом вирусывыделения получен положительный результат.

Note. Ab. – antibodies. The number of uncertain results is indicated in parentheses. *Negative result for virus isolation. **Positive result for virus isolation.

в 2017, 2018, 2020 и 2021 г. из 11 регионов 5 федеральных округов.

За указанные годы геном вируса АЧС детектировали у павших и отстрелянных кабанов, при этом большая часть проб (50) отобрана в 2021 г. в Дальневосточном федеральном округе.

Специфические антитела к вирусу АЧС в группе отстрелянных животных также детектировали во все представленные годы (в среднем 3–4 образца в год), при этом большая часть проб отобрана на территории Владимирской области (6 проб). Также поло-

жительные результаты получили при исследовании проб из Калининградской и Волгоградской областей (по 1 пробе), Республики Татарстан (3 пробы) и Хабаровского края (2 пробы).

Положительные результаты ИПМ в группе павших кабанов регистрировали в 2018 и 2021 гг., при этом большая часть проб отобрана в Приморском крае (8 проб). Также положительный результат получили в пробах из Республики Крым (2 пробы), Ярославской (2 пробы), Ростовской (1 проба) и Саратовской (1 проба) областей и Хабаровского края (2 пробы).

Отмечено, что большая часть позитивных на наличие антител и генома АЧС проб представлена образцами, отобранными от диких кабанов в Дальневосточном федеральном округе.

Также следует отметить, что при исследовании сомнительных в ПЦР-РВ образцов с помощью метода вирусывыделения в 4 пробах из Республики Татарстан обнаружен вирус АЧС при одновременном отрицательном результате на наличие антител.

Из полученных результатов выделяются случаи регистрации АЧС в образцах из Владимирской области. Так, из всех исследованных проб (59) в 2 образцах обнаружен геном вируса АЧС (восточная часть области, 2017–2018 гг.). При исследовании образца из южной части (2017 г.) в ПЦР-РВ получен сомнительный результат, а при его анализе методом вирусывыделения возбудитель выявить не удалось. Помимо этого, при исследовании 6 (3 – западная (2018 г.) и 3 – южная (2017 и 2021 гг.) части Владимирской области) проб ИПМ получен положительный результат, в то время как вирус АЧС и его геном детектировать не удалось.

Обсуждение

Российская Федерация остаётся неблагополучной по АЧС с момента заноса в 2007 г. Так, на 27 декабря 2021 г. официально нотифицированы 2087 вспышек болезни, в том числе 1256 среди домашних свиней и 831 в популяции дикого кабана [30]. Для борьбы с АЧС в стране разработан комплекс мер, который позволяет в условиях циркуляции вируса АЧС сохранять и развивать свиноводство. Частью этих мер является проведение лабораторных исследований проб (мониторинговые и подтверждающие) как от домашних, так и от диких свиней [16, 31]. Так, из более чем 550 тыс. лабораторных исследований (2011–2017 гг.) положительные результаты получены преимущественно (1645 проб) при использовании ПЦР-РВ, а специфические антитела к вирусу АЧС были выявлены только в 31 пробе сыворотки крови свиней (в том числе 28 в разгар эпизоотии на одном из СК). В то же время в Европейском союзе за период 2014–2017 гг. отмечено ежегодное увеличение выявляемой серопревалентности в популяции диких кабанов, а всего специфические антитела детектировали более чем в 600 образцах, полученных от животных данного вида [32].

Причинами низкого количества обнаружения специфических антител к вирусу АЧС на территории РФ могут являться:

- использование для мониторинговых исследований исключительно метода ТФ-ИФА, который может применяться преимущественно для исследования чистой сыворотки крови (не имеющей следов гемолиза);
- направления в случае подозрения на АЧС только цельной крови или патологического материала для исследования методами ПЦР-РВ и (или) вирусывыделения, которые детектируют геном и вирус АЧС соответственно;
- сложности отбора и доставки образцов сыворотки от диких кабанов.

При этом имеются сообщения об обнаружении изолятов вируса со сниженной вирулентностью, выделенных на территории как РФ (Московская и Липецкая области), так и сопредельных стран (Латвия, Эстония и Китай), которые вызывают хроническую и даже бессимптомную формы инфекции. Распространение данных вариантов может значительно усложнить диагностику болезни и, как следствие, борьбу и профилактику [15, 28, 29, 33, 34].

Исследование с помощью стандартных методов диагностики инфекции проб крови от свиней с хронической и бессимптомной формой болезни, полученных при экспериментальном заражении поросят, показало, что на ранних сроках (12-й д.п.з.) при использовании рутинных методов диагностики большая доля (67%) инфицированных животных детектируется при использовании ПЦР-РВ, в то время как на более поздних сроках (32-й д.п.з.) предпочтительным методом является ТФ-ИФА (100%). Однако при сравнении обобщённых результатов наиболее эффективно (79% обнаружения инфицированных животных) проводить тестирование образцов двумя методами параллельно. Использование ПЦР-РВ и ТФ-ИФА по отдельности позволило обнаружить меньшее число заражённых животных (37 и 67% соответственно). При этом использование ИПМ вне зависимости от д.п.з. позволило выявить специфические антитела в 100% исследованных проб.

Параллельное исследование в ПЦР-РВ и ИПМ проб органов и тканей от подопытных животных, убитых на 35-й д.п.з., показало, что предпочтительным методом диагностики является ИПМ, который выявил специфические антитела к вирусу АЧС в 100% отобранных проб органов и тканей. При этом геном вируса АЧС детектировали исключительно в образцах суставной ткани, в то время как исследование общерекомендованных образцов (селезёнка, лимфатические узлы, миндалины, лёгкие, почки, костный мозг) показало отрицательный результат [35]. Полученные данные показывают, что инфицированные свиньи, при исследовании рекомендованных проб от которых в ПЦР-РВ геном возбудителя АЧС не обнаруживается, могут выявляться при тестировании на наличие специфических антител. Наличие генома в пробах суставных тканей указывает на возможность этих животных являться переносчиками и источником инфекции.

С целью изучения серопревалентности и сравнения методов диагностики проведено исследование 697 проб (4 вида), отобранных от домашних свиней, а также отстрелянных и павших диких кабанов на наличие генома, вируса и специфических антител к вирусу АЧС.

Полевые образцы от домашних свиней, отобранные в 2020–2021 гг., представляли собой сыворотку крови, цельную кровь, биологический материал и продукцию свиноводства (полуфабрикаты и субпродукты) и исследованы параллельно на наличие генома (ПЦР-РВ) и специфических антител (ТФ-ИФА для сыворотки крови и ИПМ для всех видов проб).

В большей части проб (82,3%) обнаружен геном вируса АЧС, в то время как антитела детектировали в 86 из 156 образцов, положительных в ПЦР-РВ. Для полевых проб сыворотки, как и в описанном выше опыте, использование ТФ-ИФА позволило обнаружить меньшее количество инфицированных животных (4 пробы), чем ИПМ (50 проб). Результаты экспериментальных исследований подтверждают большую чувствительность ИПМ в сравнении с ТФ-ИФА, что позволяет говорить об отборе проб от животных на ранних сроках инфицирования (3–12-й д.п.з.), а обнаружение специфических антител в альтернативных для серологической диагностики образцах подтверждает возможность исследования проб данного типа, по крайней мере для ИПМ.

Параллельное исследование проб от отстрелянных и павших диких кабанов осуществляли с помощью ПЦР-РВ на наличие генома и ИПМ на наличие специфических антител. Метод ТФ-ИФА не использовали ввиду отсутствия проб сыворотки крови от кабанов.

Пробы от павших кабанов представляли собой образцы, направленные региональными лабораториями в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с целью подтверждения диагноза АЧС. При исследовании образцов данного типа в 100% проб получили положительный результат в ПЦР-РВ, а при исследовании ИПМ антитела обнаружены в 22,5% образцов, что может говорить о падеже большей части животных вследствие перенесённой острой или подострой формы инфекции и (или) снижения титра антител (детектируемого в ИПМ) ввиду отбора проб от трупов кабанов на различных стадиях разложения.

При диагностике методом ПЦР-РВ в большей части образцов от отстрелянных кабанов геном вируса АЧС не детектировали (90% проб). Положительный и сомнительный результат получили при исследовании данным методом 39 и 5 проб соответственно. Отрицательный результат для образцов крови и меньшее число общего обнаружения могут быть связаны с исследованием образцов, направленных из благополучных районов для доказательства отсутствия циркуляции вируса АЧС, а высокая доля обнаружения в пробах кабаньего мяса (75%) связана с направлением проб данного вида исключительно с целью подтверждения лабораторного диагноза. Специфические антитела к вирусу АЧС детектировали исключительно в группе образцов биологического материала и составили 3% от общего числа исследованных проб (13).

При этом, в отличие от образцов от домашних свиней и павших кабанов, где антитела детектировали исключительно в пробах, положительных в ПЦР-РВ, а доля их обнаружения была в 1,5–3 раза меньше, чем для случаев обнаружения генома, в группе отстрелянных кабанов параллельное обнаружение генома и антител отмечено только для 7 из 13 образцов, что в 5,5 раза меньше, чем случаи обнаружения генома.

Пробы, положительные в ИПМ, а также сомнительные и отрицательные в ПЦР-РВ, поступили из Владимирской области, где вспышки АЧС регистрировали в 2013–2018 гг. среди как свиней (34 случая), так

и кабанов (29 случаев) практически во всех районах области. При этом в 2016–2018 гг. болезнь регистрировали в тех же районах, где она была установлена в предыдущие годы, что могло быть обусловлено недостаточной эффективностью проведённых ранее противозoonотических мероприятий [36].

При постановке вирусовыделения положительных и сомнительной проб в ПЦР-РВ и проб, положительных в ИПМ, выявили наличие вируса исключительно в группе положительных на наличие вирусного генома. Сомнительный результат в ПЦР-РВ, отрицательный в вирусовыделении и положительный на антитела, мог явиться следствием отбора проб крови после выздоровления при перенесённой хронической или бессимптомной форме инфекции. Наличие положительных на антитела и отрицательных на геном проб, отобранных в южной части Владимирской области в 2017–2021 г. и западной в 2018 г. (последний положительный результат на геном в данных частях региона детектирован в 2017 г.), может являться следствием выздоровления данных животных (в том числе при инфицировании вариантом вируса с пониженной вирулентностью), что требует проведения параллельных (на геном и антитела) исследований с достоверной выборкой.

Таким образом, можно предположить, что на территории Владимирской области циркулировали (циркулируют) как высоковирулентные варианты вируса АЧС в северо-восточной части региона, так и варианты со сниженной вирулентностью в южной и западной частях. Однако положительный результат в ПЦР-РВ и отрицательный на антитела при исследовании проб, отобранных от отстрелянных животных, не даёт информации по свойствам циркулирующего изолята (циркулирующих изолятов) на данной территории и допускает переболевание заражённых им кабанов.

При исследовании образцов от одной группы отстрелянных кабанов, отобранных на территории охотничьего хозяйства Республики Татарстан, в 4 из 6 проб обнаружен геном вируса АЧС, а при исследовании 2 проб получен сомнительный результат. При их анализе методом вирусовыделения во всех образцах обнаружен вирус, в то время как антитела к возбудителю детектировали только в 3 пробах, из которых все были положительны в ПЦР-РВ. Данный факт может свидетельствовать о разном времени заражения животных, инкубационном периоде болезни, индивидуальных особенностях животных и (или) биологических свойствах циркулирующего изолята (циркулирующих изолятов), что требует дополнительного изучения.

В целом специфические антитела к вирусу АЧС детектировали во всех видах образцов в каждом из исследуемых годов, за исключением проб крови и полуфабрикатов от отстрелянных кабанов, отобранных на территории 17 регионов РФ. При этом большая часть серопозитивных образцов отобрана на территориях Центрального и Дальневосточного федеральных округов по 70 и 9 проб среди домашних свиней, а также по 9 и 12 среди кабанов соответственно.

Как и в описанном выше эксперименте, максимальное число инфицированных животных выявляли при параллельном исследовании образцов методами ПЦР и ИПМ. Однако данный результат получен при анализе ограниченного количества образцов от отстрелянных животных. Полученные данные подтверждают необходимость проведения параллельного тестирования проб для выявления большего числа инфицированных животных с разными формами течения болезни и раннего выявления изолятов со сниженной вирулентностью с целью принятия своевременных и редактирования текущих мер борьбы с инфекцией [9, 13, 23, 24, 37, 38].

Заключение

Эпизоотологическая ситуация по АЧС в РФ остается критичной и напряжённой с вовлечением новых регионов и возвращением болезни на оздоровлённые территории. В рамках борьбы с болезнью на территории страны проводятся мониторинговые исследования проб, полученных как от свиней, так и кабанов, молекулярно-генетическими, серологическими и вирусологическими методами. Однако положительные результаты в подавляющем большинстве случаев регистрируют при исследовании проб методом ПЦР-РВ, что может быть связано с тем, что для проведения исследований на специфические антитела к вирусу АЧС направляются исключительно пробы сыворотки крови, отобранные от домашних свиней из промышленных свиноводческих хозяйств. При этом поступают сообщения о циркуляции изолятов вируса АЧС с ослабленной вирулентностью (в том числе вызывающие хроническую и бессимптомную форму болезни), обнаруженных на территории как РФ (изоляты Odintsovo 02/14 и Lipetsk 12/16), так и сопредельных стран (изоляты Lv17/WB/Rie1 (Латвия), HJL/HRB1/20 и HeB/Q3/20 (КНР)), что позволяет инфекции стать эндемичной, усложняет её раннюю диагностику, создаёт новые проблемы при борьбе с болезнью и требует проведения параллельной молекулярно-генетической и серологической диагностики [28–30].

Проведена оценка эффективности используемых методов, и изучена возможность использования различных видов проб при диагностике хронической и бессимптомной формы АЧС. Получены подтверждающие данные о меньшей эффективности использования только одного метода исследования при сравнении с комплексным тестированием (ПЦР-РВ и ТФ-ИФА). Подтверждена большая чувствительность и возможность исследования разнообразных видов проб тканей в ИПМ, а также его способность выявлять специфические антитела на более ранних сроках, по сравнению с ТФ-ИФА. Исследование общепринятых образцов тканей и органов, отобранных от животных с хронической формой течения болезни, методом ПЦР-РВ показало отрицательный результат, в то время как геном вируса АЧС выявляли при исследовании проб суставной ткани, а в одном случае получен сомнительный результат в образце мышечной ткани.

Данные, полученные при исследовании полевых проб, подтверждают присутствие серопозитивных животных на территории РФ. Так, положительные результаты на наличие специфических антител получены при исследовании образцов, отобранных на территории 17 регионов РФ, а большая часть положительных в ИПМ проб отобрана на территории Центрального и Дальневосточного федеральных округов.

Тестирование отобранных в полевых условиях проб сыворотки крови в ИПМ позволило выявить наличие антител в большем количестве образцов, по сравнению с ТФ-ИФА (79,4 и 6,4% соответственно).

Обнаружение специфических антител исключительно в образцах, положительных на геном и отобранных от домашних свиней и павших кабанов, может говорить об отборе проб от инфицированных животных с текущим течением АЧС от сверхострой до подострой формы.

Впервые на территории Владимирской области обнаружили специфические антитела в полевых ПЦР-РВ отрицательных и одном сомнительном образцах от отстрелянных кабанов, отобранных в южной (2017 и 2021 гг.) и западной частях (2018 г.). Следует отметить, что официально notiфицированных очагов в вышеназванном регионе начиная с середины 2018 г. не выявлено.

Выявлена особенность течения инфекции в группе образцов от отстрелянных кабанов, отобранных в Республике Татарстан, где в части проб положительный результат получен исключительно при исследовании методом вирусыведения, а вторая часть образцов оказалась положительной по наличию вируса АЧС, его генома и специфических антител.

Полученные данные показывают возможность выживания части животных при инфицировании вирусом АЧС и не исключают вероятность циркуляции изолятов с пониженной вирулентностью, что требует пересмотра применяемой стратегии надзора в отношении болезни, внедрения комплексных методов диагностики, позволяющих проведение исследования образцов, альтернативных сыворотке крови, с целью обнаружения антител и (или) отбора и направления образцов сыворотки крови, в том числе от кабанов, а также доказывают необходимость проведения параллельных исследований проб методами, направленными на обнаружение как генома, так и антител.

ЛИТЕРАТУРА

1. Груздев К.Н., Иголкин А.С., Рахманов А.М., Шевцов А.А. Африканская чума свиней в России: распространение и клинико-анатомическое проявление. *Ветеринария сегодня*. 2014; (4): 10–24.
2. Beltran-Alcrudo D., Arias M., Gallardo C., Kramer S., Penrith M.L. *FAO Animal Production and Health Manual No. 19. African swine fever: Detection and diagnosis*. Rome; 2017.
3. Родионова О.М., Бабаков В.А., Колодуб Г.В. О правовой природе компенсации за убой животных в очаге эпизоотии. *Вестник Томского государственного университета. Право*. 2020; (35): 196–215. <https://doi.org/10.17223/22253513/35/17>
4. Пенрит М.Л., Губерти В., Делнер К., Луборт Х. *Пособие по подготовке чрезвычайных планов действий на случай эпидемии африканской чумы свиней. Пособие ФАО по здравоохранению и воспроизводству животных № 8*. Ереван; 2011.

5. Alonso C., Borca M., Dixon L., Revilla Y., Rodriguez F., Escrbano J.M. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(5): 613–4. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001049>
6. Pérez J., Fernández A.I., Sierra M.A., Herráez P., Fernández A., Martín de las Mulas J. Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 1998; 143(5): 136–9. <https://doi.org/10.1136/vr.143.5.136>
7. Ремыга С.Г., Першин А.С., Шевченко И.В., Иголкин А.С., Шевцов А.А. Клинические и патологоанатомические изменения у диких европейских кабанов и домашних свиней при заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня.* 2016; (3): 46–51.
8. Макаров В.В., Сухарев О.И., Цветнова И.В. Эпизоотологическая характеристика вируса африканской чумы свиней. *Ветеринарная практика.* 2013; (1): 6–16.
9. Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag.* 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
10. Gallardo C., Soler A., Nieto R., Sánchez M.A., Martins C., Pelayo V., et al. Experimental transmission of African swine fever (ASF) low virulent isolate NH/P68 by surviving pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(6): 612–22. <https://doi.org/10.1111/tbed.12431>
11. Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Res.* 2013; 173(1): 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
12. Серета А.Д., Дубровская О.А., Имамдинов А.Р., Стрижакова О.М., Васильев А.П., Синдрякова И.П. и др. Лабораторная диагностика хронической и бессимптомной форм африканской чумы свиней. *Сельскохозяйственная биология.* 2016; 51(4): 459–66. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.4.459rus>
13. Eblé P.L., Hagenaars T.J., Weesendorp E., Quak S., Moonen-Leusen H.W., Loeffen W. Transmission of African Swine Fever Virus via carrier (survivor) pigs does occur. *Vet. Microbiol.* 2019; 237: 108345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.018>
14. Nurmoja I., Petrov A., Breidenstein C., Zani L., Forth J.H., Beer M., et al. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6): 2034–41. <https://doi.org/10.1111/tbed.12614>
15. Gallardo C., Nurmoja I., Soler A., Delicado V., Simón A., Martín E., et al. Evolution in Europe of African swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Vet. Microbiol.* 2018; 219: 70–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.001>
16. Груздев К.Н., Караулов А.К., Иголкин А.С. Опыт борьбы с африканской чумой свиней в Российской Федерации и его значение для других стран. *Ветеринария сегодня.* 2020; (1): 38–43. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-38-43>
17. Петрова О.Н., Коренной Ф.И., Караулов А.К., Шевцов А.А., Гуленкин В.М. Прогноз по африканской чуме свиней в Российской Федерации на 2020 год. Available at: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/publications/asf_prognoz2020.pdf
18. Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации в 2021 г.; 2021. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2021/12-13/01.pdf>
19. Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African Swine Fever in wild boar. *Vet. Sci.* 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010005>
20. Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-Daniel I., et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in eastern European union countries: how to improve surveillance and control programs. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8): 2555–65. <https://doi.org/10.1128/JCM.00857-15>
21. OIE Terrestrial Manual 2019. Chapter 3.8.1. African swine fever (infection with African swine fever virus). Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf
22. Global African Swine Fever Research Alliance (GARA) Gap Analysis Report; 2018. Available at: <https://go.usa.gov/xPfwr>
23. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
24. Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304>
25. Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L., Gomez-Villamandos J.C., Carasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 2015; 152(1): 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.003>
26. Мима К.А., Бурмакина Г.С., Васильев А.П., Казакова А.С., Дубровская О.А., Малоголовкин А.С. и др. Сравнение методов серологической диагностики африканской чумы свиней. *Ветеринария.* 2016; (9): 49–54.
27. Стрижакова О.М., Лыска В.М., Малоголовкин А.С., Новикова М.Б., Сидлик М.В., Ногина И.В. и др. Валидация ИФА-набора для обнаружения антител к вирусу африканской чумы свиней в крови и селезенке домашних свиней и диких кабанов. *Сельскохозяйственная биология.* 2016; 51(6): 845–52. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.6.845rus>
28. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloun A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci.* 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099>
29. Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gómez C., Fernández-Pinero J., et al. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(3): 1399–404. <https://doi.org/10.1111/tbed.13132>
30. Sun E., Zhang Z., Wang Z., He X., Zhang X., Wang L., et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *China Life Sci.* 2021; 64(5): 752–65. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1904-4>
31. Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации, 2007–2021 гг. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2021/12-27/03.pdf>
32. Шевцов А.А., Петрова О.Н., Ремыга С.Г., Першин А.С., Груздев К.Н., Иголкин А.С. Анализ проведения лабораторных исследований по ряду вирусных болезней свиней на территории России в 2011–2017 гг. *Ветеринария сегодня.* 2018; (1): 42–8. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-1-24-42-48>
33. European Food Safety Authority. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *EFSA J.* 2020; 18(1): e05996. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5996>
34. Zani L., Forth J.H., Forth L., Nurmoja I., Leidenberger S., Henke J., et al. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24740-1>
35. Terrestrial Animal Health Code; 2019. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/>
36. Журавлёва В.А., Сидлик М.В., Лыска В.М., Власов М.Е., Балышев В.М. Роль кабанов в распространении африканской чумы свиней на территории Владимирской области. *Ветеринария.* 2019; (5): 3–8. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.5.03-08>
37. Schulz K., Staubach C., Blome S., Viltrop A., Nurmoja I., Conraths F.J., et al. Analysis of Estonian surveillance in wild boar suggests a decline in the incidence of African swine fever. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 8490. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44890-0>
38. Schulz K., Staubach C., Blome S., Nurmoja I., Viltrop A., Conraths F.J., et al. How to demonstrate freedom from African swine fever in wild boar – Estonia as an example. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(2): 336. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020336>

REFERENCES

1. Груздев К.Н., Иголкин А.С., Ракманов А.М., Шевтсов А.А. Африканская чума свиней в России: распространение, клинические и анатомические проявления. *Ветеринария сегодня.* 2014; (4): 10–24. (in Russian)
2. Beltran-Alcrudo D., Arias M., Gallardo C., Kramer S., Penrith M.L. *FAO Animal Production and Health Manual No. 19. African swine fever: Detection and diagnosis.* Rome; 2017.

3. Rodionova O.M., Babakov V.A., Kolodub G.V. About the legal nature of compensation for animal slaughter in the epizootic center. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Pravo.* 2020; (35): 196–215. <https://doi.org/10.17223/22253513/35/17> (in Russian)
4. Penrith M.L., Guberti V., Depner K., Lubroth J. *Preparation of African swine fever contingency plans. FAO Animal Production and Health Manual No. 8.* Rome; 2009.
5. Alonso C., Borca M., Dixon L., Revilla Y., Rodriguez F., Escribano J.M. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(5): 613–4. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001049>
6. Pérez J., Fernández A.I., Sierra M.A., Herráez P., Fernández A., Martín de las Mulas J. Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 1998; 143(5): 136–9. <https://doi.org/10.1136/vr.143.5.136>
7. Remyga S.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., Shevtsov A.A. Clinical and post-mortem signs in European wild boars and domestic pigs infected with African swine fever virus. *Veterinariya segodnya.* 2016; (3): 46–51. (in Russian)
8. Makarov V.V., Sukharev O.I., Tsvetnova I.V. Epizootological characteristics of African swine fever virus. *Veterinarnaya praktika.* 2013; (1): 6–16. (in Russian)
9. Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag.* 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
10. Gallardo C., Soler A., Nieto R., Sánchez M.A., Martins C., Pelayo V., et al. Experimental transmission of African swine fever (ASF) low virulent isolate NH/P68 by surviving pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(6): 612–22. <https://doi.org/10.1111/tbed.12431>
11. Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Res.* 2013; 173(1): 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
12. Sereda A.D., Dubrovskaya O.A., Imatdinov A.R., Strizhakova O.M., Vasil'ev A.P., Sindryakova I.P., et al. Laboratory diagnostics of chronic and asymptomatic forms of african swine fever. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2016; 51(4): 459–66. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.4.459rus> (in Russian)
13. Eblé P.L., Hagenaaars T.J., Weesendorp E., Quak S., Moonen-Leusen H.W., Loeffen W. Transmission of African Swine Fever Virus via carrier (survivor) pigs does occur. *Vet. Microbiol.* 2019; 237: 108345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.018>
14. Nurmoja I., Petrov A., Breidenstein C., Zani L., Forth J.H., Beer M., et al. Biological characteristic forms of african swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6): 2034–41. <https://doi.org/10.1111/tbed.12614>
15. Gallardo C., Nurmoja I., Soler A., Delicado V., Simón A., Martin E., et al. Evolution in Europe of African swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Vet. Microbiol.* 2018; 219: 70–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.001>
16. Gruzdev K.N., Karaulov A.K., Igolkin A.S. Experience in African swine fever control in the Russian Federation and its value for the other countries. *Veterinariya segodnya.* 2020; (1): 38–43. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-38-43> (in Russian)
17. Petrova O.N., Korennoy F.I., Karaulov A.K., Shevtsov A.A., Gulenkin V.M. Forecast for African swine fever in the Russian Federation for 2020. Available at: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/publications/asf_prognoz2020.pdf (in Russian)
18. Rosselkhoz nadzor. ASF epizootic situation in the Russian Federation in 2021. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2021/12-13/01.pdf> (in Russian)
19. Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African Swine Fever in wild boar. *Vet. Sci.* 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010005>
20. Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-Daniel I., et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in eastern European union countries: how to improve surveillance and control programs. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8): 2555–65. <https://doi.org/10.1128/JCM.00857-15>
21. OIE Terrestrial Manual 2019. Chapter 3.8.1. African swine fever (infection with African swine fever virus). Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf
22. Global African Swine Fever Research Alliance (GARA) Gap Analysis Report; 2018. Available at: <https://go.usa.gov/xPFWr>
23. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
24. Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304>
25. Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L., Gomez-Villamandos J.C., Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 2015; 152(1): 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.003>
26. Mima K.A., Burmakina G.S., Vasil'ev A.P., Kazakova A.S., Dubrovskaya O.A., Malogolovkin A.S., et al. Comparison methods of serological diagnostic African swine fever. *Veterinariya.* 2016; (9): 49–54. (in Russian)
27. Strizhakova O.M., Lyska V.M., Malogolovkin A.S., Novikova M.B., Sidlik M.V., Nogina I.V., et al. Validation of an ELISA kit for detection of antibodies against ASF virus in blood or spleen of domestic pigs and wild boars. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2016; 51(6): 845–52. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.6.845rus> (in Russian)
28. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloun A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci.* 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099>
29. Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gómez C., Fernandez-Pinero J., et al. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(3): 1399–404. <https://doi.org/10.1111/tbed.13132>
30. Sun E., Zhang Z., Wang Z., He X., Zhang X., Wang L., et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Sci. China Life Sci.* 2021; 64(5): 752–65. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1904-4>
31. Rosselkhoz nadzor. ASF epizootic situation in the Russian Federation, 2007–2021. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2021/12-27/03.pdf> (in Russian)
32. Shevtsov A.A., Petrova O.N., Remyga S.G., Pershin A.S., Gruzdev K.N., Igolkin A.S. Analysis of laboratory tests for several viral swine diseases in Russia in 2011–2017 foot-and-mouth disease. *Veterinariya segodnya.* 2018; (1): 42–8. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-1-24-42-48> (in Russian)
33. European Food Safety Authority. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *EFSA J.* 2020; 18(1): e05996. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5996>
34. Zani L., Forth J.H., Nurmoja I., Leidenberger S., Henke J., et al. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24740-1>
35. Terrestrial Animal Health Code; 2019. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/>
36. Zhuravleva V.A., Sidlik M.V., Lyska V.M., Vlasov M.E., Balyshv V.M. The role of wild boars in the spread of ASF in the Vladimir region. *Veterinariya.* 2019; (5): 3–8. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.5.03-08> (in Russian)
37. Schulz K., Staubach C., Blome S., Viltrop A., Nurmoja I., Conraths F.J., et al. Analysis of Estonian surveillance in wild boar suggests a decline in the incidence of African swine fever. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 8490. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44890-0>
38. Schulz K., Staubach C., Blome S., Nurmoja I., Viltrop A., Conraths F.J., et al. How to demonstrate freedom from African swine fever in wild boar – Estonia as an example. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(2): 336. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020336>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-116>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Определение оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины вируса оспы коз (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Capripoxvirus*) против узелкового дерматита

Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Усембай А.К., Булатов Е.А.

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Введение. Узелковый дерматит, оспа овец и оспа коз являются опасными заболеваниями домашних жвачных животных, оказывающими губительное воздействие на животноводство в эндемичных регионах, нанося колоссальный экономический ущерб государству. Представители рода каприпоксвирусов антигенно схожи и могут использоваться в качестве вакцины для трёх инфекций, как в случае с представителями рода ортопоксвирусов, куда входят вирусы натуральной оспы, оспы озязан, оспы коров, составляющие единое семейство *Poxviridae*.

Материалы и методы. В данной работе использованы вакцинный штамм G₂₀-LKV вируса оспы коз и вирулентный штамм НИИПББ-2019/К вируса узелкового дерматита. Опыты проводили на клинически здоровом, серонегативном к поксвирусам крупном рогатом скоте (КРС) породы «Казахская белоголовая» 6–8-месячного возраста. При работе использовались вирусологические и серологические методы исследований.

Результаты. Все иммунизированные животные, получившие разные дозы вакцины, проявили устойчивость к контрольному заражению вирулентным вирусом узелкового дерматита КРС без проявления каких-либо клинических признаков болезни. У животных, получивших наименьшие дозы вакцины (15 000, 30 000 и 40 000 ТЦД₅₀), в месте введения не наблюдалось нежелательных явлений, кожной (припухлость) и температурной реакции. А у вакцинированных высокими дозами препарата (60 000 и 80 000 ТЦД₅₀) отмечалась реакция в виде припухлостей в месте введения, которые рассасывались в течение 3–4 суток. Контрольные животные, инфицированные вирулентным вирусом, проявляли клинические признаки болезни узелкового дерматита КРС.

Заключение. Вакцина, приготовленная на основе штамма G₂₀-LKV вируса оспы коз, обладает протективными свойствами в отношении заражения КРС вирулентным вирусом узелкового дерматита. Иммунизирующая доза вакцин от 15 000 до 80 000 ТЦД₅₀ зависит от эпизоотической ситуации узелкового дерматита в определенный момент в конкретном регионе.

Ключевые слова: вирус; вакцина; оспа коз; узелковый дерматит; иммунизирующая доза

Для цитирования: Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Усембай А.К., Булатов Е.А. Определение оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины вируса оспы коз (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Capripoxvirus*) против узелкового дерматита. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 304-309. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-116>

Для корреспонденции: Булатов Ербол Акенович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией технологии культивирования микроорганизмов, РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: erbol_km@mail.ru

Участие авторов: Абитаев Р.Т. – оформление статьи, проведение экспериментов, отбор проб биологического материала; Кондибаева Ж.Б. – анализ литературных данных, проведение экспериментов; Аманова Ж.Т. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, перевод; Саметова Ж.Ж. – проведение экспериментов, постановка серологических реакций; Усембай А.К. – проведение экспериментов, вакцинация животных, отбор проб биологического материала, наблюдение и уход за экспериментальными животными; Булатов Е.А. – руководство, планирование, обработка результатов исследований, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научно-технической программы «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021–2023 гг. и государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2021 г.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории технологии культивирования микроорганизмов и руководству Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этические утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен локальной комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности КН МОН РК (протокол № 4 от 14.04.2021).

Поступила 24.06.2022
Принята в печать 11.08.2022
Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-116>

Determination of the optimal immunizing dose of heterologous goat pox virus vaccine (Poxviridae: *Chordopoxvirinae*: *Capripoxvirus*) against lumpy skin disease

Ruslan T. Abitaev, Zhanat B. Kondibaeva, Zhanat T. Amanova, Zhanna Zh. Sametova, Abdurahman K. Ussembay, Yerbol A. Bulatov

RSE "Research Institute for Biological Safety Problems" of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan

Introduction. Lumpy skin disease (LSD), sheep pox and goat pox are dangerous diseases of domestic ruminants. Representatives of the genus of capripoxviruses are antigenically similar and can be used as a vaccine for three infections, as in the case of representatives of the genus of orthopoxviruses, which includes viruses of smallpox, monkeypox, and cowpox, that all belong to a single family *Poxviridae*.

Materials and methods. In this study, the vaccine strain G₂₀-LKV of the goat pox virus and the virulent strain RIBSP-2019/K of the LSD virus were used. The experiments were carried out on clinically healthy cattle of the Kazakh White-headed breed, aged six to eight months. Virological and serological research methods were used in the work.

Results. All immunized animals that received different doses of the vaccine showed resistance to the infection challenge, without showing any clinical signs of the disease. In animals that received the lowest doses of the vaccine 15,000, 30,000 and 40,000 TCID₅₀, no adverse events, skin and temperature reactions were observed at the injection site. Those vaccinated with high doses of the vaccine had a local reaction in the form of swelling at the site of vaccine administration. Control animals infected with a virulent virus showed clinical signs of the cattle lumpy skin disease.

Conclusion. The vaccine, prepared based on the "G₂₀-LKV" strain of the goat virus, is protective for cattle against infection with a virulent LSD virus at immunizing doses from 15,000 to 80,000 TCID₅₀, which are dependent on the LSD epizootic situation in particular region.

Keywords: *virus; vaccine; goat pox; lumpy skin disease; immunizing dose*

For citation: Abitaev R.T., Kondibaeva Zh.B., Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Ussembay A.K., Bulatov Ye.A. Determination of the optimal immunizing dose of heterologous goat pox virus vaccine (Poxviridae: *Chordopoxvirinae*: *Capripoxvirus*) against lumpy skin disease. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 304-309 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-116>

For correspondence: Yerbol A. Bulatov, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of Technology of cultivation of Microorganisms, RSE "Research Institute for Biological Safety Problems" of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan. E-mail: erbol_km@mail.ru

Information about the authors:

Abitaev R.T., <https://orcid.org/0000-0001-5609-2491>

Kondibaeva Zh.B., <https://orcid.org/0000-0002-8224-8047>

Amanova Zh.T., <https://orcid.org/0000-0002-3987-6814>

Sametova Zh.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-2332-2841>

Ussembay A.K., <https://orcid.org/0000-0003-3639-3793>

Bulatov Ye.A., <https://orcid.org/0000-0001-8543-4219>

Contribution: Abitaev R.T. – design of the article, conducting experiments, sampling biological material; Kondibaeva Zh.B. – analysis of literary data, conducting experiments; Amanova Zh.T. – concept and design of the study, conducting experiments, translating the text; Sametova Zh.Zh. – conducting experiments, staging serological reactions; Ussembay A.K. – conducting experiments, vaccination of animals, sampling of biological material, observation and care of experimental animals; Bulatov Ye.A. – management, planning, processing of research results, approval of the final version of the article for publication, communication with the editorial board.

Funding. The work was carried out within the framework of the Scientific and Technical program "Biological safety of the Republic of Kazakhstan: threat assessment, scientific and technical basis for their prevention and elimination" for 2021–2023 and the state task "Biological safety services in the field of science" for 2021.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to all employees of the Laboratory of Microbial cultivation Technology and the management of the Research Institute of Biological Safety Problems.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the local bioethics Commission of the RSE "Research Institute of Biological Safety Problems" of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Protocol No. 4 dated 14.04.2021).

Received 24 June 2022

Accepted 11 August 2022

Published 31 August 2022

Введение

Узелковый дерматит (нодулярный дерматит, бугорчатка), оспа овец и оспа коз являются опасными заболеваниями домашних жвачных животных, оказывающими губительное воздействие на животноводство, овцеводство и козоводство в эндемичных регионах, нанося колоссальный экономический ущерб государству [1–3].

Оспа овец (Sheep pox), оспа коз (Goat pox) и нодулярный дерматит (Lumpy skin disease) представляют собой заболевания овец, коз и крупного рогатого скота (КРС), вызываемые штаммами рода *Capripoxvirus*, входящими в обширное семейство *Poxviridae*. Вирусы, поражающие овец и коз, не полностью зависят от хозяина – некоторые вызывают заболевания как у овец, так и у коз, как в ситуации с вирусом оспы обезьян, который поражает людей и отнесён к тому же семейству *Poxviridae*. Штаммы вируса, вызывающие заболевания у КРС, по-видимому, специфичны для него, и это отражается в различном географическом распространении узелкового дерматита, а также оспы овец и коз [3–5]. Все исследованные к настоящему времени штаммы каприпоксвируса антигенно схожи. Из-за этой антигенной гомологии всех штаммов существует возможность использования одного вакцинного штамма для трёх инфекций [3, 6], как при ортопоксвирусах: по данным Всемирной организации здравоохранения, эффективность вакцины от натуральной оспы для профилактики оспы обезьян составляет около 85% [7].

Национальный ветеринарный институт (NVI) Эфиопии производит аттенуированную вакцину Neethling против нодулярного дерматита для КРС и вакцину KSGP O-180 против оспы овец, коз и КРС [8, 9]. Метод производства вакцин в NVI соответствует рекомендациям, установленным органами Африканского союза и Panaфриканского контроля качества вакцин (AU-PANVAC). Кроме того, вакцинные штаммы были предоставлены AU-PANVAC [10]. Недавние молекулярные исследования показали, что, несмотря на своё название, в реальности Lumpy skin disease virus идентичен штамму KSGP O-240 [11, 12]. Следует оценивать и учитывать идентичность и аттенуированность штамма вируса при выборе штаммов вакцин для использования у КРС, овец и коз. Защитная доза зависит от используемого вакцинного штамма [13].

Ранее нами были проведены исследования по изучению безопасности и иммуногенности вакцинного штамма НИСХИ вируса оспы овец и штамма G₂₀-LKV вируса оспы коз, используемых для специфической профилактики оспы овец, оспы коз, против узелкового дерматита КРС. При этом для иммунизации КРС данными вакцинами нами были испытаны высокие дозы, которые составляли 80 000 ТЦД₅₀, а для проверки безопасности использовались десятикратные дозы – 800 000 ТЦД₅₀. При этом у вакцинированного обоими препаратами КРС в течение 21 дня наблюдения каких-либо клинических признаков болезней не было выявлено, за исключением местной реакции в виде припухлостей, которые исчезали в течение 2–3 дней. Температура тела оставалась в норме. В крови вакци-

нированных животных начиная с седьмых суток выявляли вируснейтрализующие антитела [14].

Целью данных исследований являлось определение оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины на основе вируса оспы коз для КРС против узелкового дерматита.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали аттенуированный вакцинный штамм G₂₀-LKV вируса оспы коз (GenBank: AY077836.1), полученный путём последовательных пассажей в культуре клеток почки ягнят с биологической активностью 10^{6,00} ТЦД₅₀/см³, и эпизоотический вирус узелкового дерматита, вирулентный штамм НИИПББ-2019/К, полученный из изолята 2016 г., выделенного от КРС во время вспышки инфекции в Атырауской области Республики Казахстан, с инфекционной активностью 10^{5,5} ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток тестикулов ягнят.

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины использовали КРС породы «Казахская белоголовая» 6–8-месячного возраста живой массой от 75 до 110 кг. Опыты проводили на клинически здоровых, невакцинированных против узелкового дерматита животных (КРС). До вакцинации определяли иммунный фон КРС в реакции нейтрализации на наличие антител к вирусу узелкового дерматита КРС.

Животные были распределены на 6 групп по 3 голы в каждой. Животные 1–5-й групп были иммунизированы подкожно в область средней трети шеи в объеме 2,0 мл гетерологической вакциной в дозах 15 000, 30 000, 40 000, 60 000 и 80 000 ТЦД₅₀ соответственно. Животные 6-й группы получили инъекцию фосфатно-солевого буфера (PBS) в том же объёме.

На 21-е сутки после вакцинации животных опытных и контрольной групп подвергали контрольному заражению вирулентным штаммом вируса узелкового дерматита КРС из штамма НИИПББ-2019/К. Контрольное заражение проводили методом титрования вирулентного вируса.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен локальной комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности КН МОН РК (протокол № 4 от 14.04.2021).

Результаты

Результаты проведённых опытов по определению оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины для КРС представлены в **таблице**.

Данные **таблицы** показывают, что все испытанные животные (КРС), получившие разные дозы гетерологической вакцины, по-разному реагировали на её введение. У животных, получивших наименьшие дозы вакцины (15 000, 30 000 и 40 000 ТЦД₅₀), на месте введения препарата кожной реакции не наблюдалось.

Таблица. Реакция животных, вакцинированных разными дозами гетерологической вакцины, после контрольного заражения вирулентным вирусом методом титрования

Table. Reaction of animals vaccinated with different doses of heterologous vaccine after infection challenge with virulent virus by titration method

Группа животных Group of animals	Доза вакцины, ТЦД ₅₀ и контрольного вируса Dose of vaccine, TCD ₅₀ and challenge virus	Номера иммунизированных животных, гол. IDs of immunized animals	Реакция животных после вакцинации Reaction of animals after vaccination	Реакция животных после контрольного заражения методом титрования Reaction of animals after infection challenge by titration method
Опытная Experienced	15 000	46131628	Отсутствует Absent	-----
		39494096	Отсутствует Absent	-----
		39494097	Отсутствует Absent	-----
	30 000	61839893	Отсутствует Absent	-----
		46021531	Отсутствует Absent	-----
		46021532	Отсутствует Absent	-----
	40 000	58645	Отсутствует Absent	-----
		38346	Отсутствует Absent	-----
		38365	Отсутствует Absent	-----
	60 000	39494098	Припухлость Swelling	-----
		61839878	Отсутствует Absent	-----
		46021547	Отсутствует Absent	-----
	80 000	46131667	Припухлость Swelling	-----
		61840046	Припухлость Swelling	-----
		61839872	Отсутствует Absent	-----
Контрольная Control	1000	38370	–	+++++
		38345	–	+++++
		38366	–	+++++

А у животных, получивших дозы вакцины от 60 000 до 80 000 ТЦД₅₀, в месте введения вакцины наблюдались воспалительные отеки в виде припухлостей до 1–2 см в диаметре, которые постепенно исчезали (рассасывались) в течение 2–3 дней. Температура тела у животных оставалась в пределах нормы. Общее состояние животных было удовлетворительным.

Через три недели после вакцинации все животные оставались клинически здоровыми без каких-либо изменений аппетита и поведения. Побочных явлений, припухлости на месте введения не выявлено.

Через 21 день после вакцинации всех привитых разными дозами (рисунк *а*) и невакцинированных контрольных животных (рисунк *б*) инфицировали вирулентным штаммом НИИПББ-2019/К вируса узелкового дерматита КРС. При этом все испытанные животные, получившие разные дозы вакцины, были устойчивы к контрольному заражению. У вакцинированных животных не наблюдалось клинических признаков, характерных для узелкового дерматита КРС, в течение 14 суток наблюдения (рисунк *б*), тогда как контрольные животные заболели с характерными клиническими признаками узелкового дерматита (рисунк *в*): повышением температуры тела до 41,5°C на протяжении 4–7 суток, появлением на месте введения вируса сначала припухлостей, которые в дальнейшем переходили в папулы и на 10–12-е сутки превращались в везикулы с развитием некротических узелков

(рисунк *з*). При вскрытии отмечалось, что подкожная клетчатка на месте инфицирования инфильтрирована экссудатом, а окружающие ткани отёчны. Бугорок на разрезе имел творожистую структуру (рисунк *д*).

Обсуждение

В борьбе с узелковым дерматитом в качестве вакцин используют живые аттенуированные штаммы каприпоксвирусов [15–17], которые являются кросс-реактивными в пределах рода. Все штаммы каприпоксвируса овец, коз или КРС, исследованные в настоящее время, имеют основной нейтрализующий сайт, так что животные, перенёсшие заражение одним штаммом, становятся резистентными к заражению другими штаммами [18]. Таким образом, существует возможность использования отдельного штамма каприпоксвируса для защиты как овец, так и коз от всех полевых изолятов вируса, независимо от того, имеют они азиатское или африканское происхождение [19, 20].

Ранее в Египте во время вспышки нодулярного дерматита использовали румынский штамм вакцины против оспы овец. Однако перед тем, как вводить в организм новый вакцинный штамм, который обычно не используется для КРС, рекомендуется проводить контрольные пробные испытания. Все штаммы каприпоксвируса, которые обычно используют в качестве вакцин, могут продуцировать сильную локальную реакцию в участке инокуляции у КРС вида *Bos*

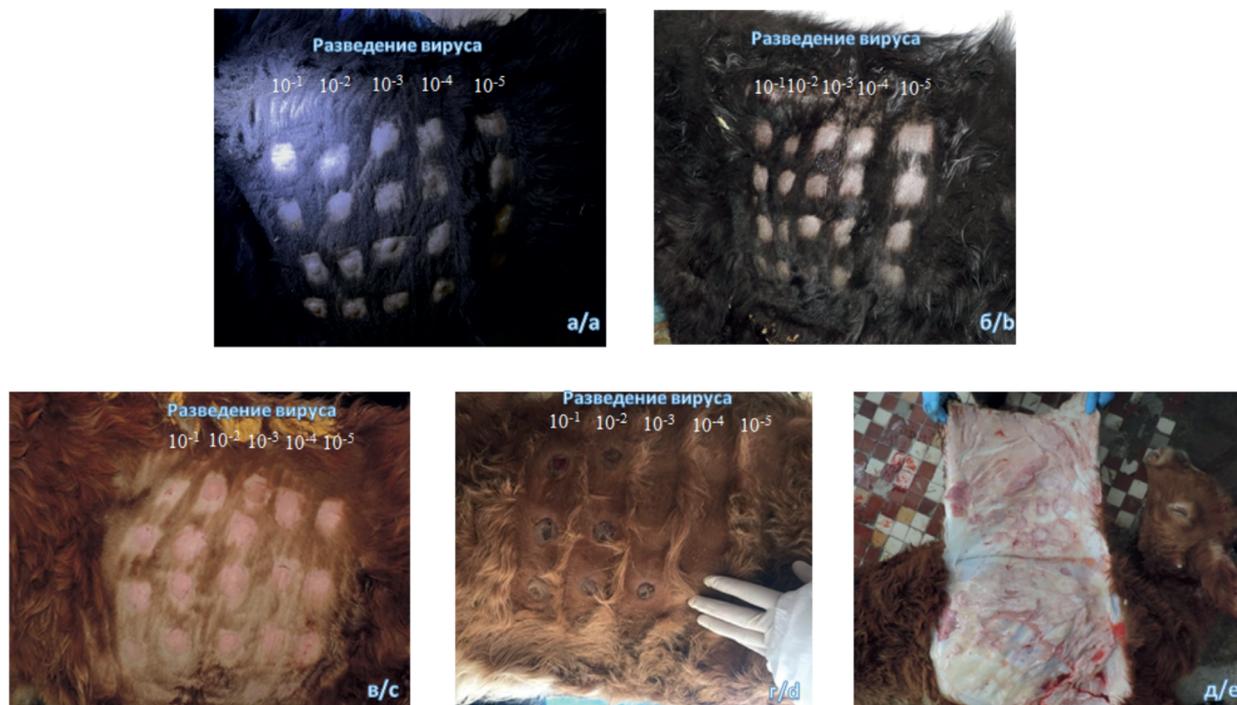


Рис. Кожная реакция у вакцинированных и контрольных животных: *a* – место введения контрольного вирулентного вируса у вакцинированного животного (1-е сутки); *b* – вакцинированное животное после контрольного заражения (8-е сутки); *v* – место введения у контрольного животного, инфицированного вирулентным вирусом (1-е сутки); *z* – некротические узелки на коже контрольного животного (12-е сутки); *d* – подкожные изменения при вскрытии контрольного животного.

Fig. Skin reaction of vaccinated and control animals: *a* – the place of administration of the virulent virus to vaccinated animal (day 1); *b* – the vaccinated animal after the infection challenge (day 8); *c* – the place of administration of the virulent virus to control animal (day 1); *d* – necrotic nodules on the skin of the control animal (day 12); *e* – subcutaneous changes during autopsy of the control animal.

taurus [21]. Это препятствует использованию вакцины даже несмотря на то, что последствия вспышки узелкового дерматита всегда более тяжёлые.

Недавние исследования показывают, что высокая доза вакцины оспы овец из штамма RM-65 также может вызвать побочные эффекты [6].

По данным G. Gari и соавт. (2015), испытания эфиопских вакцин Neethling, O-180 вируса оспы овец и изготовленной Иорданским центром биоиндустрии (JOVAC) вакцины штамма Gorgan вируса оспы коз показали, что последняя защищала всех вакцинированных телят от высоковирулентного эфиопского полевого штамма вируса узелкового дерматита КРС. Результаты реакции гиперчувствительности замедленного типа показали, что КРС, вакцинированный данной вакциной, имел высокий уровень клеточного иммунного ответа, что указывает на более высокие уровни иммуногенности [22].

Использованный нами аттенуированный штамм G₂₀-LKV вируса оспы коз был получен из полевого изолята вируса оспы коз путём проведения 20 серийных пассажей в клетках почки ягнят. Вакцина, приготовленная из этого штамма, обеспечивала иммунитет у привитых коз через пять дней, а напряжённый иммунитет сохранялся не менее 12 месяцев [23].

Результаты исследования показали, что все животные, вакцинированные разными испытанными дозами гетерологической вакцины, были устойчивы к кон-

трольному заражению вирулентным штаммом вируса узелкового дерматита КРС. При этом локальная реакция в участках инокуляции вакцины не отмечалась, кроме незначительной припухлости, которая на 3–4-е сутки рассасывалась без проявления каких-либо клинических признаков болезни.

Заключение

Таким образом, вакцина, изготовленная на основе штамма G₂₀-LKV вируса оспы коз, обладает протективными свойствами в отношении заражения КРС вирулентным вирусом узелкового дерматита при иммунизирующих дозах от 15 000 до 80 000 ТЦД₅₀. Оптимальная иммунизирующая доза для КРС составляет 15 000 ТЦД₅₀, при которой у вакцинированных животных не отмечается поствакцинальных осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Shisler J.L., Gari G., Mekonnen G.A., Juleff N., et al. Capripoxvirus diseases: current status and opportunities for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(3): 729–45. <https://doi.org/10.1111/tbed.12444>.
2. Babiuk S. Vaccines against lumpy skin disease virus and vaccination strategies. In: Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E., eds. *Lumpy Skin Disease*. Berlin: Springer; 2018.
3. Barnard B.J., Munz E., Dumbell K., Prozesky L. Lumpy skin disease. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C., eds. *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town, South Africa: Oxford University Press; 1994: 604–12.

4. Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B., Wallace D.B., Kitching R.P. Capripoxviruses: An emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 2008; 55(7): 263–72. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01043.x>
5. Carn V.M., Kitching R.P. The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.* 1995; 140(3): 503–13. <https://doi.org/10.1007/BF01718427>
6. Abutarbush S.M., Tuppurainen E.S.M. Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65(6): 1657–63. <https://doi.org/10.1111/tbed.12923>
7. ВОЗ. Информационный бюллетень. Оспа обезьян. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>
8. Ben-Gera J., Klement E., Khinich E., Stram Y., Shpigel N.Y. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10 RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease – the results of a randomized controlled field study. *Vaccine.* 2015; 33(38): 4837–42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.071>
9. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hegde R., Kumar M.M., Moorthy A.R.S. A classical live attenuated vaccine for sheep pox. *Trop. Anim. Health Prod.* 2004; 36(4): 307–20. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000026661.88631.50>
10. Tuppurainen E.S.M., Antoniou S.E., Tsiamadis E., Topkaridou M., Labus T., Debeljak Z., et al. Field observations and experiences gained from the implementation of control measures against lumpy skin disease in South-East Europe between 2015 and 2017. *Prev. Vet. Med.* 2020; 181: 104600. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.006>
11. Kitching R.P., Bhat P.P., Black D.N. The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol. Infect.* 1989; 102(2): 335–43. <https://doi.org/10.1017/s0950268800030016>
12. Tulman E., Alfonso C., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N., et al. The genomes of sheep pox and goat pox viruses. *J. Virol.* 2002; 76(12): 6054–61. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.76.12.6054-6061.2002>
13. Kitamura T., Kitamura Y., Tagaya I. Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys. *Nature.* 1967; 215(5106): 1187–8. <https://doi.org/10.1038/2151187a0>
14. Zhugunissov K., Bulatov Ye., Orynbayev M., Kutumbetov L., Abduraimov Ye., Shayakhmetov Ye., et al. Goatpox virus (G20-LKV) vaccine strain elicits a protective response in cattle against lumpy skin disease at challenge with lumpy skin disease virulent field strain in a comparative study. *Vet. Microbiol.* 2020; 245: 108695. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108695>
15. Brenner J., Haimovitz M., Oron E., Stram Y., Fridgut O., Bumberov V., et al. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, June 2006. *Isr. J. Vet. Med.* 2006; 61(3/4): 73–7.
16. Coakley W., Capstick P.B. Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.* 1961; 2(4): 369–71. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34941-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34941-5)
17. Capstick P.B. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev Biol (Basel)* 2003; 114:161-7.
18. Capstick P.B. *Veterinary Department Annual Report.* Kenya; 1961: 45–47.
19. Kitching R.P., Hammond J.M., Taylor W.P. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 1986; 42(1): 53–60.
20. Kitching R.P., Taylor W.P. Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop. Anim. Health Prod.* 1985; 17(2): 64–74. <https://doi.org/10.1007/bf02360774>
21. Davies F.G., Krauss H., Lund L.J., Taylor M. The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.* 1971; 12(2): 123–7.
22. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine.* 2015; 33(28): 3256–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.035>
23. Абдураимов Е.О. Разработка технологии изготовления вирусвакцины против оспы коз. Диссертация на соискания кандидата ветеринарных наук. Алматы; 2001.
24. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Shisler J.L., Gari G., Mekonnen G.A., Juleff N., et al. Capripoxvirus diseases: current status and opportunities for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(3): 729–45. <https://doi.org/10.1111/tbed.12444>
25. Babiuk S. Vaccines against lumpy skin disease virus and vaccination strategies. In: Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E., eds. *Lumpy Skin Disease.* Berlin: Springer; 2018.
26. Barnard B.J., Munz E., Dumbell K., Prozesky L. Lumpy skin disease. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C., eds. *Infectious Diseases of Livestock.* Cape Town, South Africa: Oxford University Press; 1994: 604–12.
27. Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B., Wallace D.B., Kitching R.P. Capripoxviruses: An emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 2008; 55(7): 263–72. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01043.x>
28. Carn V.M., Kitching R.P. The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.* 1995; 140(3): 503–13. <https://doi.org/10.1007/BF01718427>
29. Abutarbush S.M., Tuppurainen E.S.M. Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65(6): 1657–63. <https://doi.org/10.1111/tbed.12923>
30. WHO. Fact sheet. Monkeypox. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>
31. Ben-Gera J., Klement E., Khinich E., Stram Y., Shpigel N.Y. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10 RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease – the results of a randomized controlled field study. *Vaccine.* 2015; 33(38): 4837–42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.071>
32. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hegde R., Kumar M.M., Moorthy A.R.S. A classical live attenuated vaccine for sheep pox. *Trop. Anim. Health Prod.* 2004; 36(4): 307–20. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000026661.88631.50>
33. Tuppurainen E.S.M., Antoniou S.E., Tsiamadis E., Topkaridou M., Labus T., Debeljak Z., et al. Field observations and experiences gained from the implementation of control measures against lumpy skin disease in South-East Europe between 2015 and 2017. *Prev. Vet. Med.* 2020; 181: 104600. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.006>
34. Kitching R.P., Bhat P.P., Black D.N. The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol. Infect.* 1989; 102(2): 335–43. <https://doi.org/10.1017/s0950268800030016>
35. Tulman E., Alfonso C., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N., et al. The genomes of sheep pox and goat pox viruses. *J. Virol.* 2002; 76(12): 6054–61. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.76.12.6054-6061.2002>
36. Kitamura T., Kitamura Y., Tagaya I. Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys. *Nature.* 1967; 215(5106): 1187–8. <https://doi.org/10.1038/2151187a0>
37. Zhugunissov K., Bulatov Ye., Orynbayev M., Kutumbetov L., Abduraimov Ye., Shayakhmetov Ye., et al. Goatpox virus (G20-LKV) vaccine strain elicits a protective response in cattle against lumpy skin disease at challenge with lumpy skin disease virulent field strain in a comparative study. *Vet. Microbiol.* 2020; 245: 108695. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108695>
38. Brenner J., Haimovitz M., Oron E., Stram Y., Fridgut O., Bumberov V., et al. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, June 2006. *Isr. J. Vet. Med.* 2006; 61(3/4): 73–7.
39. Coakley W., Capstick P.B. Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.* 1961; 2(4): 369–71. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34941-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34941-5)
40. Capstick P.B. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev Biol (Basel)* 2003; 114:161-7.
41. Capstick P.B. *Veterinary Department Annual Report.* Kenya; 1961: 45–47.
42. Kitching R.P., Hammond J.M., Taylor W.P. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 1986; 42(1): 53–60.
43. Kitching R.P., Taylor W.P. Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop. Anim. Health Prod.* 1985; 17(2): 64–74. <https://doi.org/10.1007/bf02360774>
44. Davies F.G., Krauss H., Lund L.J., Taylor M. The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.* 1971; 12(2): 123–7.
45. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine.* 2015; 33(28): 3256–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.035>
46. Abduraimov E.O. *Development of Manufacturing Technology for Goatpox Virus Vaccine. Dissertation for the Degree of Candidate of Veterinary Science [Razrabotka tekhnologii izgotovleniya virusvaksiny protiv ospy koz. Dissertatsiya na soiskaniya kandidata veterinarnykh nauk].* Almaty; 2001. (in Russian)

REFERENCES

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области

Щемелев А.Н.¹, Семенов А.В.², Останкова Ю.В.¹, Найденова Е.В.³, Зуева Е.Б.¹, Валутите Д.Э.¹, Чурина М.А.⁴, Виролайнен П.А.¹, Тотолян Арег А.¹

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;

²Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620030, г. Екатеринбург, Россия;

³ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, г. Саратов, Россия;

⁴СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина», 191167, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Как известно на сегодняшний день, эпидемия ВИЧ-инфекции в Калининградской области преимущественно была связана с распространением рекомбинантной формы вируса (CRF03_AB), однако регулярные заносы ВИЧ из других стран и частей света создали благоприятные условия для формирования и распространения его разнообразных рекомбинантных форм.

Наиболее полная информация о разнообразии рекомбинантных форм в регионе необходима для понимания структуры лекарственной устойчивости (ЛУ), так как влияние ассоциированных с ней мутаций на приспособленность вируса может быть неодинаковым для разных субтипов, причём рекомбинантные формы могут сочетать в своём геноме наиболее удачные паттерны мутаций, что позволит ВИЧ с большей эффективностью противостоять антиретровирусной терапии.

Цель работы. Изучение генетического разнообразия ВИЧ-1 в Калининградской области.

Материалы и методы. Исследованы 162 образца плазмы крови, полученные от пациентов из Калининградской области как с подтверждённой вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, так и с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. Для обратной транскрипции и амплификации ВИЧ использовали диагностический набор «АмплиСенс HIVResist-Seq» (ЦНИИЭ, Россия).

Результаты и обсуждение. Доминирующими в группе являлись различные рекомбинанты между субтипами А и В (74%), в том числе CRF03_AB и субтипом А (33,95%) и рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB (CRF03_AB-like (13,58%). Среди «чистых» субтипов вируса доминирует характерный для территории Российской Федерации суб-субтип – А6 (16,67%), одновременно с ним циркулируют субтипы В (3,70%) и G (1,23%).

Были выявлены 96 пациентов (59,26%) хотя бы с одной мутацией, ассоциированной с ЛУ к антиретровирусным препаратам.

Заключение. Выявленное разнообразие субтипов и рекомбинантных форм вируса указывает на то, что в исследуемом регионе продолжается активный процесс формирования новых рекомбинантов, причём между как уже существующими рекомбинантными формами и «чистыми» субтипами, так и между «чистыми» субтипами.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека; ВИЧ; рекомбинантные формы ВИЧ; лекарственная устойчивость ВИЧ; лабораторная диагностика

Для цитирования: Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Чурина М.А., Виролайнен П.А., Тотолян Арег А. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

Для корреспонденции: Щемелев Александр Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: tvil-dorm@gmail.com

Участие авторов: Щемелев А.Н. – проведение исследований, подбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Останкова Ю.В. – проведение исследований, подбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Семенов А.В. – организация исследований, написание текста статьи; Найденова Е.В. – проведение исследований, написание текста статьи; Валутите Д.Э. – проведение исследований; Зуева Е.Б. – проведение исследований; Тотолян Арег А. – общее руководство, написание текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протоколы исследования № 3 от 07.04.2010 и № 47 от 25.12.2018 одобрены Этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Поступила 26.05.2022
Принята в печать 21.07.2022
Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region

Alexander N. Shchemelev¹, Aleksandr V. Semenov², Yulia V. Ostankova¹, Ekaterina V. Naidenova³, Elena B. Zueva¹, Diana E. Valutite¹, Mariia A. Churina⁴, Pavel A. Virolainen¹, Areg A. Totolian¹

¹FBSI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 197101, St. Petersburg, Russia;

²Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the Federal Research Institute, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector” of the Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 620030 Ekaterinburg, Russia;

³FSSI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 410005, Saratov, Russia;

⁴St. Petersburg GBUZ «Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital», 191167, St. Petersburg, Russia

Introduction. As is currently known, the epidemic process in the Kaliningrad Region was mainly associated with the spread of the recombinant form of HIV-1 (CRF03_AB); however, regular HIV importations from other countries and continents has created favorable conditions for emergence and spread of various recombinant forms of the virus.

The most complete information on the diversity of recombinant forms in the region is also necessary to understand the structure of drug resistance (DR).

The aim of the study was to explore the HIV-1 genetic diversity in the Kaliningrad Region.

Materials and methods. We studied 162 blood plasma samples obtained from patients from the Kaliningrad Region, both with confirmed virological failure of antiretroviral therapy (ART) and with newly diagnosed HIV infection. For reverse transcription and amplification of HIV genome fragments, diagnostic «AmpliSense HIVResist-Seq».

Results and discussion. The various recombinants between subtypes A and B (74%) were predominant in study group: recombinant was between CRF03_AB and subtype A (33.95%) and CRF03_AB-like (13.58%) were the most common. Among the “pure” subtypes of the virus, subtype A6 (16.67%). The circulation of subtypes B (3.70%) and G (1.23%) was also noted.

Ninety-six patients (59.26%) were identified with at least one mutation associated with antiretroviral (ARV) drug resistance.

Conclusion. The observed diversity of subtypes and recombinant forms of the virus implies that the new recombinants are actively emerging in the studied region, both between existing recombinant forms and “pure” subtypes, as well as between “pure” subtypes.

Keywords: *human immunodeficiency virus; HIV; recombinant forms of HIV; HIV drug resistance; laboratory diagnostics*

For citation: Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Churina M.A., Virolainen P.A., Totolian Areg A. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

For correspondence: Alexander Nikolaevich Shchemelev, Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 197101, Saint-Petersburg, Russia. E-mail: tvildorm@gmail.com

Information about the authors:

Shchemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Semenov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Ostankova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Zueva E.B., <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Valutite D.E., <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Churina M.A., <https://orcid.org/0000-0003-0424-4654>

Virolainen P.A., <https://orcid.org/0000-0001-5918-9395>

Totolian A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Contribution: Shchemelev A.N. – spend research, selection of literature, statistical data processing, preparation of illustrative material, writing the text of the article; Ostankova Yu.V. – conducting research, selecting literature, statistical data processing, preparing illustrative material, writing the text of the article; Semenov A.V. – organization of research, writing the text of the article; Naydenova E.V. – conducting research, writing the text of the article; Valutite D.E. – researching; Zueva E.B. – researching; Churina M. A. – researching; Virolainen P.A. – researching; Totolyan Areg A. – general guidance, writing the text of the article.

Conflict of interest. The authors confirm that there is no conflict of financial/non-financial interests associated with writing the article.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol Research protocols No. 3 dated 04/07/2010 and No. 47 dated December 25, 2018 was approved by the Ethics Committee of the Saint-Petersburg Pasteur Institute

Received 26 May 2022

Accepted 21 July 2022

Published 31 August 2022

Введение

Вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), впервые выявленный в 1980-х гг., циркулирует в человеческой популяции около 100 лет. За это время сформировалась устойчивая филогенетическая структура, представленная тремя большими группами: N, O, M; последняя, в свою очередь, разделяется на 12 независимых ветвей-субтипов, включающих вирусные штаммы, более тесно связанные друг с другом, чем с другими субтипами [1, 2]. Первоначально классификация ВИЧ-1 была основана на последовательностях субгеномных областей или отдельных генов, однако совершенствование методов секвенирования дало возможность классифицировать ВИЧ-1 на основе полноразмерных геномов или последовательностей из нескольких субгеномных областей. Это позволило идентифицировать штаммы с характерными частями их геномов, соответствующих разным субтипам: подобные штаммы являются продуктами рекомбинации между родительскими штаммами, принадлежащими к разным субтипам. Когда ту или иную рекомбинантную форму идентифицируют у трёх или более человек без прямой эпидемиологической связи, её классифицируют как циркулирующую рекомбинантную форму (CRF). В настоящее время известно более 100 CRF [3], в совокупности их вклад в глобальную эпидемию ВИЧ составляет не менее 20% [4], в том числе потому, что рекомбинантные формы преобладают в нескольких регионах, таких как Западная и Центральная Африка (CRF02_AG) [5, 6] и Юго-Восточная Азия (CRF01_AE) [7, 8].

Рекомбинантные формы вируса являются результатом рекомбинации в ходе обратной транскрипции. В процессе синтеза антисмысловой цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) обратная транскриптаза (ОТ) с высокой частотой смещается с одной цепи рибонуклеиновой кислоты (РНК) на другую, и можно предположить, что, по крайней мере, обе копии геномной РНК альтернативно используются в качестве матриц. Частоту смены выбора копии у ВИЧ-1 между очень похожими матричными РНК оценивают в 3×10^{-4} – $1,4 \times 10^{-3}$ событий на нуклеотид, т.е. 3–12

переключений матрицы на репликацию генома [9–11]. Важно отметить, что образование вирионов, содержащих две разные геномные РНК, требует выполнения определённых условий: во-первых, два или более вируса с разными генотипами должны инфицировать одну и ту же клетку, во-вторых, геномные РНК разного происхождения должны быть впоследствии совместно упакованы. Подобная ситуация может быть связана либо с коинфекцией, либо с суперинфекцией пациента различными субтипами вируса.

Тот факт, что белки Nef и Vpr подавляют экспрессию CD4 и корецепторов во время инфекции ВИЧ-1, даёт основание предполагать крайне редкое возникновение суперинфекции [12]. Тем не менее гибридизация клеток пациентов *in situ* показала, что отдельные клетки могут содержать более четырёх различных провирусов [13, 14]. Кроме того, темпы образования новых рекомбинантных форм и их распространение, показанные в настоящее время, свидетельствуют о высокой частоте коинфекции *in vivo* [4, 15]. Таким образом, для активного образования рекомбинантных форм вируса необходимо выполнение важного условия – совместной циркуляции разных субтипов ВИЧ в регионе.

В Российской Федерации доминирующим суб-субтипом вируса является А6, также называемый IDU-A (Injecting Drug Users), или A-FSU (former Soviet Union countries). Данный суб-субтип ранее классифицировали как А1, но в связи со значимыми отличиями от других вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А1 в строении и распространении его выделили в отдельную сравнительно однородную группу [16, 17]. Тем не менее в некоторых регионах показана благоприятная обстановка для совместной циркуляции нескольких субтипов. В число таких регионов входит Калининградская область, так как её центр является крупным транспортным узлом с железными и шоссейными дорогами, морским и речным портами, международным аэропортом.

Как известно на сегодняшний день, эпидемический процесс в Калининградской области на начальном этапе был связан с распространением рекомбинантной формы вируса (CRF03_AB) в среде потребителей

инъекционных наркотиков. В дальнейшем ВИЧ-инфекция вышла за пределы уязвимых групп населения. Кроме того, регулярные заносы ВИЧ из других стран и частей света создали благоприятные условия для формирования новых разнообразных рекомбинантных форм вируса в регионе [18, 19].

Примечательно, что распространение субтипов и рекомбинантных форм в эпидемии ВИЧ-инфекции очень динамично: сейчас генетическое разнообразие вируса представлено смесью рекомбинантов, возникших на ранних этапах глобальной эпидемии, и других, более позднего происхождения, и все они способствуют созданию более сложных рекомбинантных форм, которые в дальнейшем внесут свой вклад в динамику глобальной популяции ВИЧ-1. Можно предположить, что подобный процесс образования всё более сложных рекомбинантных форм окажется основным направлением эволюционного развития вируса в Калининградской области.

Целью работы являлось изучение генетического разнообразия ВИЧ-1 в Калининградской области.

Материалы и методы

В ходе работы в 2014–2018 гг. был исследован клинический материал от 162 пациентов из Калининградской области как с подтверждённой вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии (АРТ), так и с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. Плазма крови для определения устойчивых штаммов ВИЧ была направлена в Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом (СЗО Центр СПИД) на базе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В полученной плазме крови была определена вирусная нагрузка набором реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» (ЦНИИЭ, Россия) с порогом чувствительности 500 копий/мл. Образцы с определяемой вирусной нагрузкой в дальнейшем подвергали полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией РНК в ДНК (ОТ-ПЦР) и секвенированию по Сэнгеру. Для обратной транскрипции и амплификации ВИЧ использовали диагностические наборы «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev» и «ПЦР-комплект-Pro/Rev» (ЦНИИЭ, Россия), секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору «АмплиСенс HIVResist-Seq» (ЦНИИЭ, Россия). Генотипирование ВИЧ-1 проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена *pol* протяженностью 1302 нт., кодирующего протеазу (PR) и часть обратной транскриптазы (RT/OT) в области 2253–3554 нт., координаты даны для представленного в международной базе данных GenBank ВИЧ HXB2 (K03455.1). Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе дан-

ных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [20]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа применяли алгоритм Neighbor Joining, позволяющий оптимизировать деревья в соответствии с критерием сбалансированной минимальной эволюции. При оценке достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Bootstrap для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

Генотипирование исследуемых штаммов проводили параллельно в программе REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 [21] и на основании анализа их филогенетических отношений с референсными последовательностями из международной базы данных GenBank. Для выявления и анализа рекомбинантных форм применяли программу REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0, используя параметры, предустановленные в программе (размер окна 400, шаг 20). Анализ генетических последовательностей ВИЧ-1 на наличие мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ) проводили при помощи Стэнфордской базы данных (Stanford HIV DB) [22]. Анализ мутационных профилей проводили путём построения линейных диаграмм при помощи ПО Linear Diagram Generator [23].

Статистическую обработку данных производили с помощью пакетов программ MS Excel Professional Plus 2013 (Microsoft), Prizm v5.0 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали точный интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представляли с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали (в зависимости от характеристик выборок) точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йейтса. В качестве порога достоверности отличий значение вероятности определили как $p < 0,05$.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Протоколы исследования № 3 от 07.04.2010 и № 47 от 25.12.2018 одобрены Этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Результаты и обсуждение

Получены последовательности 162 штаммов ВИЧ-1, которые были депонированы в GenBank под номерами ON367567 – ON367728. Для всех был определен их суб-субтип (**табл. 1**). При этом учитывали как данные, полученные при генотипировании при помощи инструментов REGA HIV Subtyping Tool 3.0 и jumping profile Hidden Markov Model (jpHMM) (Приложение А), так и результаты филогенетического исследования, проведенного в ПО Mega X (**рис. 1**).

Доминирующими в группе являлись различные рекомбинанты между субтипами А и В (74%;

Таблица 1. Распределение исследованных штаммов по субтипам ВИЧ-1

Table 1. Distribution of isolates by HIV-1 subtypes

Субтип Subtype	Количество штаммов Number of isolates	Доля в выборке, % Sample Share, %	95% ДИ, % 95% CI, %	
			–	+
HIV-1 Subtype A3	2	1,23	0,15	4,39
HIV-1 Subtype A6	27	16,67	11,28	23,31
HIV-1 Subtype B	6	3,70	1,37	7,89
HIV-1 Subtype G	2	1,23	0,15	4,39
HIV-1 CRF03_AB	41	25,31	18,81	32,73
HIV-1 CRF03_AB-like	22	13,58	8,71	19,84
Recombinant of 03_AB, A	55	33,95	26,71	41,79
HIV-1 CRF02_AG	4	2,47	0,68	6,20
Recombinant of A1, B	2	1,23	0,15	4,39
Recombinant of K, J	2	1,23	0,15	4,39

95% ДИ 66,61–80,63%), наиболее часто встречали рекомбинант между CRF03_AB и субтипом А (33,95%; 95% ДИ 26,71–41,79%). Кроме того, значительную долю (13,58%; 95% ДИ 8,71–19,84%) составляла рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB (CRF03_AB-like), но вклад «чистых» субтипов в формирование данной рекомбинантной формы не до конца ясен.

Доминирование в регионе рекомбинантов между субтипами А и В, в том числе CRF03_AB, согласуется с описанным в литературе генетическим разнообразием вируса в Калининградской области [16, 18, 19]. Тем не менее обращает на себя внимание неоднородность внутри клады рекомбинантов на филогенетическом дереве, что может быть связано как с особенностями эпидемиологических связей, так и с формированием в регионе новых циркулирующих рекомбинантных форм. Данный вопрос требует изучения полных геномов штаммов вируса из Калининградской области.

Среди рекомбинантов между субтипами А и В особого внимания заслуживают три штамма, отмеченные на филогенетическом дереве (рис. 1). На дендрограмме рекомбинанты между субтипами А и В образуют крупный гетерогенный кластер, а данные штаммы отделены от них, несмотря на то что в составе их гена *pol* присутствуют фрагменты, соответствующие субтипам А и В, что было подтверждено сравнительным рекомбинационным анализом в различном ПО (рис. 2). При этом их субтипирование в различных инструментах (REGA, Geno2Pheno, NCBI, Stanford HIV DB, RIP) не позволяет сделать окончательный вывод о генотипической принадлежности данных штаммов. Необходимо отметить, что все три образца имеют различное расположение на дендрограмме: штамм HIV1_2014_24_KG наиболее приближен к другим рекомбинантным формам между субтипами А и В; штамм HIV1_2014_19_KG кластеризуется со штаммами субтипа В; а штамм HIV1_2014_25_KG образует наиболее раннее ответвление – на уровне расхождения А-, В-рекомбинан-

тов и других субтипов ВИЧ-1. Пациенты, от которых были получены все три штамма, инфицированы относительно недавно (срок инфекции менее одного года) и не получали АРТ. При анализе генетических последовательностей на хроматограммах были выявлены многочисленные вырожденные фрагменты, т.е. присутствие нескольких различных нуклеотидов в одних и тех же позициях генома. Наблюдаемая ситуация, как известно, может свидетельствовать о разнообразии вирусной популяции в организме пациента, в том числе о коинфекции разными субтипами ВИЧ [24]. Отмечая вышесказанное, можно предположить, что обозначенные выше штаммы находятся в начале процесса рекомбинации ретровирусов, т.е. представлены преимущественно не рекомбинантными формами, а вариантами вируса с совместно упакованными в капсиде геномами А- и В-штаммов.

Кроме рекомбинантов между субтипами А и В, были встречены более редкие для европейской части России CRF02_AG, а также рекомбинанты между субтипами К и J [26].

Среди «чистых» субтипов вируса доминирует характерный для территории Российской Федерации субтип А, представленный двумя суб-субтипами – А6 (16,67%; 95% ДИ 11,28–23,31%) и А3 (1,23%; 95% ДИ 0,15–4,39%); одновременно с ним циркулируют субтипы В (3,70%; 95% ДИ 1,37–7,89%) и G (1,23%; 95% ДИ 0,15–4,39%).

Исследуемый регион демонстрирует распределение субтипов ВИЧ-1, отличное от других регионов России в целом и Северо-Западного федерального округа в частности [27–29]. Для сравнения значимости различий генетического разнообразия между регионами Северо-Западного федерального округа были выбраны суб-субтип А6, субтип В и рекомбинантные формы между субтипами А и В, поскольку именно они встречаются не только среди изученных нами образцов, но также и в штаммах из Архангельской [28] и Ленинградской области [29]. Для оценки



Рис. 1. Результаты филогенетического анализа при помощи алгоритма Neighbor Joining.

- – референсные последовательности (табл. 2);
- ▲ – рекомбинантные формы между субтипами A и B, не кластеризующиеся с другими рекомбинантами этой группы.

Fig. 1. Results of phylogenetic analysis using the Neighbor Joining algorithm.

- – reference sequences (table 2);
- ▲ – recombinant forms between subtypes A and B, not clustered with other recombinants of this group.

достоверности различий был использован критерий χ^2 с поправкой Йейтса. При этом достоверных различий между встречаемостью субтипов ВИЧ-1 в Архангельской и Ленинградской областях не выявлено, но наблюдается статистически значимое различие генетического разнообразия между ними и Калининградской областью (χ^2 составляет 254,277; критическое значение χ^2 при уровне значимости $p = 0,01$ составляет 13,277).

Такие различия в генетическом разнообразии объясняются доминированием рекомбинантных форм ВИЧ-1 в Калининградской области, в то время как в Архангельской и Ленинградской областях они бы-

ли встречены в единичных случаях. Одновременно с этим разнообразие «чистых» субтипов ВИЧ-1 соотносится с описанным в литературе [27–29], среди них также наблюдается преобладание субтипа A, преимущественно суб-субтипа A6.

Факт того, что в регионе преобладают варианты вируса, представляющие собой рекомбинант между CRF03_AB и субтипом A, а также рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB, но имеющая от неё ряд отличий (CRF03_AB-like), соотносится с представлением о том, что при длительной совместной циркуляции в популяции рекомбинантных форм и «чистых» субтипов вируса формируются новые, более сложные

Таблица 2. Наименование референсных последовательностей из GenBank, использованных в филогенетическом анализе
Table 2. Names of reference sequences from GenBank used in phylogenetic analysis

Суб-субтип Sub-subtype	Номер последовательности на филогенетическом дереве Number sequence in phylogenetic tree	Номер последовательности из GenBank Number sequence in GenBank	Регион происхождения Region of origin	Суб-субтип Sub-subtype	Номер последовательности на филогенетическом дереве Number sequence in phylogenetic tree	Номер последовательности из GenBank Number sequence in GenBank	Регион происхождения Region of origin
A1	ref4	AF069670	Сомали Somali	C	ref37	AY772699	Африка Africa
A1	ref8	AB287376	Руанда Ruanda	F1	ref9	AF075703	Финляндия Finland
A1	ref16	U51190	Уганда Uganda	G	ref5	AF061641	Финляндия Finland
A1	ref25	EU110087	Кения Kenia	G	ref10	U88826	Нигерия Nigeria
A1	ref27	AF484509	Уганда Uganda	G	ref38	AF084936	Конго Congo
A1	ref36	AF107771	Швеция Sweden	J	ref44	EF614151	Конго Congo
A2	ref13	AF286237	Кипр Cyprus	J	ref45	GU237072	Камерун Cameron
A3	ref1	AY521631	Сенегал Senegal	J	ref46	AF082394	Швеция Sweden
A3	ref20	AY521629	Швеция Sweden	K	ref42	AJ249235	Камерун Cameron
A6	ref15	HQ449397	Россия, Краснодар Russia, Krasnodar	K	ref43	AJ249239	Камерун Cameron
A6	ref19	HQ161930	Россия, Смоленск Russia, Smolensk	CRF02_AG	ref2	AF063224	Джибути Djibouti
A6	ref24	EF589043	Казахстан Kazakhstan	CRF02_AG	ref3	GU201514	Камерун Cameron
A6	ref30	AY500393	Россия, Москва Russia, Moscow	CRF02_AG	ref6	KT124792	Германия Germany
A6	ref31	AF413987	Украина Ukraine	CRF02_AG	ref14	AB231898	Гана Ghana
B	ref18	M17449	США USA	CRF02_AG	ref17	EU786671	Испания Spain
B	ref22	KJ771697	Германия Germany	CRF02_AG	ref26	AB231896	Гана Ghana
B	ref29	HM586190	Великобритания Great Britain	CRF02_AG	ref28	AY151001	Эквадор Ecuador
B	ref32	AY713409	США USA	CRF02_AG	ref33	AF377954	Камерун Cameron
B	ref34	AY173951	Таиланд Thailand	CRF06_cpx	ref39	HQ529257.1	Гана Ghana
C	ref7	AF067155	Индия India	CRF03_AB	ref12	AF193276	Россия, Калининград Russia, Kaliningrad
C	ref23	U52953	Бразилия Brazil	CRF03_AB	ref41	AF414006.1	Беларусь Belarus
C	ref35	U46016	Эфиопия Ethiopia	CRF06_cpx	ref40	MN605500.1	Гвинея-Бисау Guinea-Bissau

рекомбинантные формы с включением в геном новых фрагментов [4].

Помимо генотипического анализа, было проведено исследование встречаемости в данном регионе мутаций, ассоциированных с ЛУ. При этом были исследованы штаммы, полученные как от пациентов с неэффективностью АРТ ($n = 107$), так и с впервые выявленной инфекцией ($n = 55$). Первичная ЛУ была

выявлена всего в двух случаях (3,64%; 95% ДИ 0,44–12,53%), поэтому дальнейший анализ объединяет всех пациентов с выявленными мутациями ЛУ.

Всего было встречено 80 различных мутаций, ассоциированных с ЛУ. Из них большая часть – мутации ЛУ к ингибиторам ОТ, в том числе к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) – 31 замена (38,75%; 95% ДИ 28,06–50,30%) и к нуну-

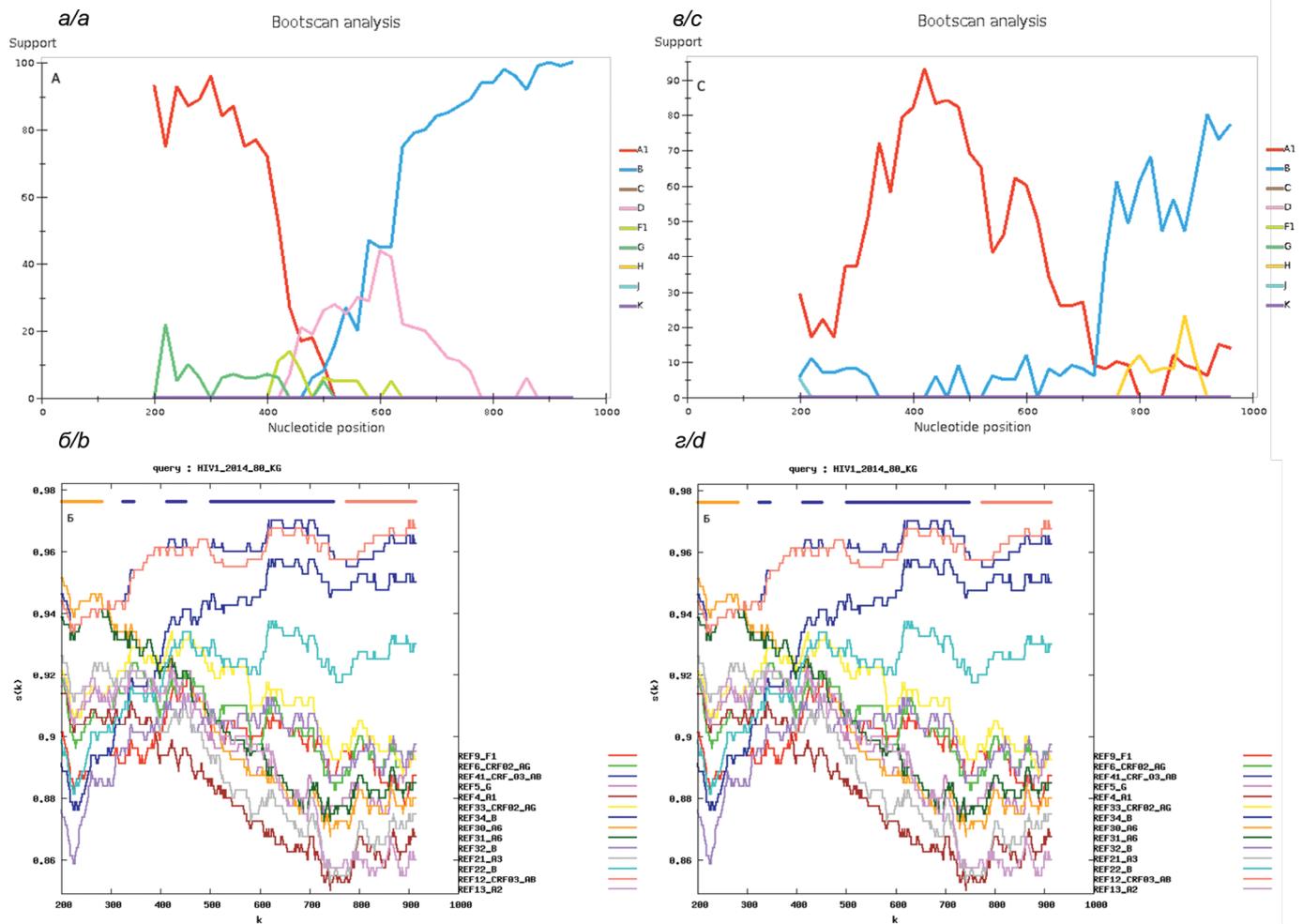


Рис. 2. Сравнительный рекомбинационный анализ образцов 2014_80 (CRF03_AB) и 2014_19 (A + B recombinant) в Rega HIV Subtyping Tool v3.0 [21] и Recombinant Identification Program [25].

a – образец 2014_80 в Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *б* – образец 2014_80 в Recombinant Identification Program; *в* – образец 2014_19 в Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *г* – образец 2014_19 в Recombinant Identification Program [25].

Fig. 2. Comparative recombination analysis of samples 2014_80 (CRF03_AB) and 2014_19 (A + B recombinant) in Rega HIV Subtyping Tool v3.0 [21] and Recombinant Identification Program (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>)

a – sample 2014_80 in Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *b* – sample 2014_80 in the Recombinant Identification Program; *c* – sample 2014_19 in Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *d* – sample 2014_19 in the Recombinant Identification Program [25].

клеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) – 35 мутаций (43,75%; 95% ДИ 32,68–55,30%); меньшая доля разнообразия мутаций приходится на замены, ассоциированные с ЛУ к ингибиторам протеазы (ИП) – 14 (17,50%; 95% ДИ 9,91–27,62%).

У 96 пациентов (59,26%; 95% ДИ 51,27–66,90%) были выявлены штаммы ВИЧ-1 хотя бы с одной мутацией, ассоциированной с ЛУ к антиретровирусным препаратам. Наиболее часто встречались мутации ЛУ к ингибиторам ОТ. В 13 случаях были встречены мутации ЛУ к НИОТ, в 4 – ННИОТ, в 66 – НИОТ + ННИОТ. Кроме того, у 13 пациентов были встречены мутации ЛУ к ИП: у 10 – ИП + НИОТ, у 3 – ИП + НИОТ + ННИОТ.

Среди мутаций ЛУ к НИОТ наиболее часто показаны мутации M184V [30] (65,63%; 95% ДИ 55,23–

75,02%), L74V [31] (19,79%; 95% ДИ 12,36–29,17%), Y115F [32] (14,58%; 95% ДИ 8,21–23,26%), остальные замены встречались в 10% случаев и реже. При анализе множества мутационных профилей путём построения линейных диаграмм можно проследить образующиеся устойчивые паттерны мутаций ЛУ (рис. 3 *a*). Подробно описанные в литературе сочетания мутаций, ассоциированные с ЛУ к тимидиновым аналогам (thymidine analog mutations – TAM), встречены в полученных профилях в единичных случаях. Существует два основных пути формирования паттернов TAM: мутации, возникающие вместе с T215Y (включая M41L, L210W и иногда D67N), составляют кластер TAM-1; мутации, возникающие вместе с K70R (включая D67N, T215F и K219Q), составляют кластер TAM-2. Тем не менее в данном случае оба кластера мутаций ассоциированы с заме-

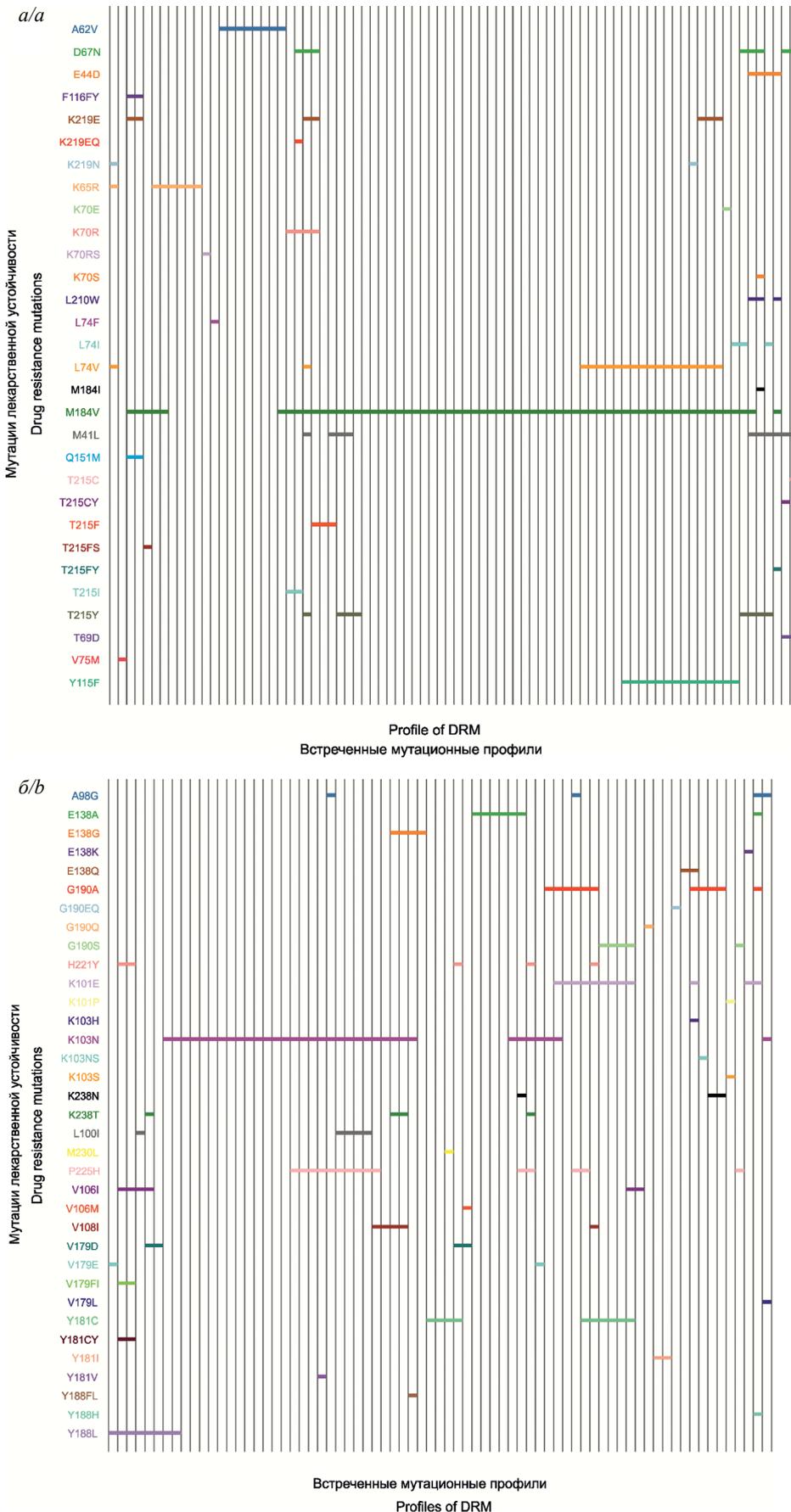


Рис. 3. Результаты исследования множества мутационных профилей путём построения линейных диаграмм: *a* – для мутаций устойчивости к НИОТ; *b* – для мутаций устойчивости к ННИОТ.

Fig. 3. Results of the study of multiple mutational profiles by constructing line diagrams: *a* – for NRTI resistance mutations; *b* – for NNRTI resistance mutations.

ной T215Y, в то время как известно, что формирование паттерна по пути TAM-2 обладает наибольшими преимуществами с заменой T215F, которая также показана в изученных мутационных профилях, но не в составе паттернов TAM [33]. Доминирующими являлись профили, несущие не-TAM мутации, среди них обнаружена устойчивая связь замен L74V + Y115F. Данные мутации связаны преимущественно с ЛУ к абакавиру и диданозину, но существуют сведения об их ассоциации с ЛУ к тенофовиру [31, 32], который, в свою очередь, входит в большинство современных схем антиретровирусной терапии. Кроме того, во всех случаях данное сочетание встречено вместе с заменой M184V, что, скорее всего, связано с присутствием данной замены у большинства штаммов, обладающих ЛУ.

Анализ встречаемости мутаций ЛУ к ННИОТ показал, что наиболее распространены замены K103N [34] (36,46%; 95% ДИ 26,87–46,91%), K101E [35] (12,50%; 95% ДИ 6,63–20,82%), G190A [36] (11,46%; 95% ДИ 5,86–19,58%), P225H (15,63%; 95% ДИ 9,02–24,46%), Y18C [37] (12,50%; 95% ДИ 6,63–20,82%); остальные мутации встречались менее чем в 10% случаев. Изучение профилей мутаций ЛУ в полученных штаммах (рис. 3 б) позволило обнаружить связь между заменами K101E + G190A/S, причём данное сочетание встречается преимущественно без наиболее распространённой мутации K103N. Также выявлена зависимость замены в 190-й позиции на аланин (A) или серин (S) от субтипа вируса. Замена 190A встречалась только в рекомбинантах между субтипами A и B, а мутация 190S – преимущественно в штаммах субсубтипа A6 (в пяти из шести случаев). В литературе также описана распространённость замены в 190-й позиции ОТ на серин для субтипа A [38–40] и аланин для не-A субтипов [38, 41, 42].

Заключение

Полученные в исследовании результаты указывают на значительное разнообразие рекомбинантных форм в Калининградской области. При этом преобладание рекомбинантов между CRF03_AB и A указывает на то, что основным источником рекомбинации является совместная циркуляция варианта, характерного для исследуемого региона – CRF03_AB, и суб-субтипа A6, распространённого на остальной территории России. Вклад совместной циркуляции с субтипом B не выявлен.

Выявленное разнообразие субтипов и рекомбинантных форм вируса указывает на то, что в исследуемом регионе продолжается активный процесс формирования новых рекомбинантов, причём между как уже существующими рекомбинантными формами и «чистыми» субтипами, так и «чистыми» субтипами. Подобная активность вируса указывает на необходимость изучения полных геномов штаммов, полученных в Калининградской области, для описания всех рекомбинантных форм, циркулирующих там на сегодняшний день.

ЛИТЕРАТУРА

- Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. 2000; 288(5472): 1789–96. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789>
- Kuiken C., Foley B., Hahn B., Marx P., McCutchan F., Mellors J.W., et al. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos: 1999.
- Los Alamos National Laboratory. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Simon-Loriere E., Rossilillo P., Negroni M. RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. *RNA Biol*. 2011; 8(2): 280–6. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15193>
- McCutchan F.E., Carr J.K., Bajani M., Sanders-Buell E., Harry T.O., Stoeckli T.C., et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*. 1999; 254(2): 226–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9505>
- Montavon C., Toure-Kane C., Liegeois F., Mpoudi E., Bourgeois A., Vergne L., et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 2000; 23(5): 363–74. <https://doi.org/10.1097/00126334-200004150-00001>
- Menu E., Truong T.X., Lafon M.E., Nguyen T.H., Müller-Trutwin M.C., Nguyen T.T., et al. HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12(7): 629–33. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.629>
- Piyasirisilp S., McCutchan F.E., Carr J.K., Sanders-Buell E., Liu W., Chen J., et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J. Virol*. 2000; 74(23): 11286–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11286-11295.2000>
- Galetto R., Mouton A., Giacomoni V., Veron M., Charneau P., Negroni M. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo. *J. Biol. Chem*. 2004; 279(35): 36625–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.m405476200>
- Zhuang J., Jetzt A.E., Sun G., Yu H., Klarmann G., Ron Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity and putative hot spots. *J. Virol*. 2002; 76(22): 11273–82. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002>
- Jetzt A.E., Yu H., Klarmann G.J., Ron Y., Preston B.D., Dougherty J.P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol*. 2000; 74(3): 1234–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1234-1240.2000>
- Piantadosi A., Chohan B., Chohan V., McClelland R.S., Overbaugh J. Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 2007; 3(11): 177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030177>
- Gratton S., Cheynier R., Dumaurier M.J., Oksenhendler E., Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(26): 14566–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14566>
- Jung A., Maier R., Vartanian J.P., Bocharov G., Jung V., Fischer U., et al. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*. 2002; 418(6894): 144. <https://doi.org/10.1038/418144a>
- Chen J., Dang Q., Unutmaz D., Pathak V.K., Maldarelli F., Powell D., et al. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J. Virol* 2005; 79(7): 4140–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4140-4149.2005>
- Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol*. 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
- Schlösser M., Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., et al. HIV-1 sub-subtype A6: Settings for normalised identification and molecular epidemiology in the Southern Federal District, Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>
- Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O., et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombi-

- nant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS*. 1998; 12(14): 1907–19. <https://doi.org/10.1097/00002030-199814000-00023>
19. Lebedev A., Pasechnik O., Ozhmegova E., Antonova A., Blokh A., Grezina L., et al. Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0241269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241269>
 20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 21. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Available at: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
 22. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. HIVdb Program: Mutations Analysis. Available at: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>
 23. Gottfried B. A comparative study on linear and region based diagrams. *J. Spat. Inf. Sci.* 2015; (10): 3–20.
 24. Лаповок И.А., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. Исследование частоты встречаемости двойной ВИЧ-инфекции в России. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148>
 25. Los Alamos National Laboratory. RIP: Recombinant Identification Program. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>
 26. Пасечник О.А., Блох А.И. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(2): 127–38. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138>
 27. Федеральный центр по борьбе со СПИД. Российская база данных. ЛУ ВИЧ у наивных пациентов; 2020. Available at: <http://www.hivruussia.info/wp-content/uploads/2020/12/2020-Rossijskaya-baza-dannyh-LU-VICH-u-naivnyh-patsientov.pdf>
 28. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>
 29. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А. и др. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022; 99(1): 28–37. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-216>
 30. Hung M., Tokarsky E.J., Lagpacan L., Zhang L., Suo Z., Lansdon E.B. Elucidating molecular interactions of L-nucleotides with HIV-1 reverse transcriptase and mechanism of M184V-caused drug resistance. *Commun. Biol.* 2019; 2: 469. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0706-x>
 31. De Luca A., Giambenedetto S.D., Trotta M.P., Colafigli M., Properi M., Ruiz L., et al. Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(11): 1645–53. <https://doi.org/10.1086/522231>
 32. Lanier E.R., Givens N., Stone C., Griffin P., Gibb D., Walker S., et al. Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. *HIV Med.* 2004; 5(6): 394–9. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2004.00243.x>
 33. Hu Z., Giguel F., Hatano H., Reid P., Lu J., Kuritzkes D.R. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006; 80(14): 7020–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.02747-05>
 34. Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse-transcriptase inhibitor-resistance mutations. *Future Microbiol.* 2011; 6(3): 295–315. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.7>
 35. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Huang W., Oliveira M., Han Y., Quan Y., et al. Role of the K101E substitution in HIV-1 reverse transcriptase in resistance to rilpivirine and other nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5649–57. <https://doi.org/10.1128/aac.01536-13>
 36. Madrugá J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007; 370(9581): 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61047-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61047-2)
 37. Archer R.H., Wisniewski M., Bambara R.A., Demeter L.M. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry*. 2001; 40(13): 4087–95. <https://doi.org/10.1021/bi002328a>
 38. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014; 28(17): F1–8. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
 39. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>
 40. Чурина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В. и др. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017; 9(1): 82–92. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92>
 41. Chen M., Zhu Q., Xing H., Chen H., Jin X., Dong L., et al. The characteristics of pretreatment HIV-1 drug resistance in western Yunnan, China. *Epidemiol. Infect.* 2020; 148: e102. <https://doi.org/10.1017/s095026882000093x>
 42. Cheung K.W., Peng Q., He L., Cai K., Jiang Q., Zhou B., et al. Rapid and simultaneous detection of major drug resistance mutations in reverse transcriptase gene for HIV-1 CRF01_AE, CRF07_BC and subtype B in China using sequenom MassARRAY® system. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0153641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153641>

REFERENCES

1. Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. 2000; 288(5472): 1789–96. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789>
2. Kuiken C., Foley B., Hahn B., Marx P., McCutchan F., Mellors J.W., et al. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos; 1999.
3. Los Alamos National Laboratory. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
4. Simon-Loriere E., Rossolillo P., Negroni M. RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. *RNA Biol.* 2011; 8(2): 280–6. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15193>
5. McCutchan F.E., Carr J.K., Bajani M., Sanders-Buell E., Harry T.O., Stoeckli T.C., et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*. 1999; 254(2): 226–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9505>
6. Montavon C., Toure-Kane C., Liegeois F., Mpoudi E., Bourgeois A., Vergne L., et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2000; 23(5): 363–74. <https://doi.org/10.1097/00126334-200004150-00001>
7. Menu E., Truong T.X., Lafon M.E., Nguyen T.H., Müller-Trutwin M.C., Nguyen T.T., et al. HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12(7): 629–33. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.629>
8. Piyasirisilp S., McCutchan F.E., Carr J.K., Sanders-Buell E., Liu W., Chen J., et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11286–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11286-11295.2000>
9. Galetto R., Moumen A., Giacomoni V., Veron M., Charneau P., Negroni M. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene

- determines a recombination hot spot in vivo. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(35): 36625–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.m405476200>
10. Zhuang J., Jetzt A.E., Sun G., Yu H., Klarmann G., Ron Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity and putative hot spots. *J. Virol.* 2002; 76(22): 11273–82. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002>
 11. Jetzt A.E., Yu H., Klarmann G.J., Ron Y., Preston B.D., Dougherty J.P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* 2000; 74(3): 1234–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1234-1240.2000>
 12. Piantadosi A., Chohan B., Chohan V., McClelland R.S., Overbaugh J. Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 2007; 3(11): 177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030177>
 13. Gratten S., Cheyner R., Dumaurier M.J., Oksenhendler E., Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(26): 14566–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14566>
 14. Jung A., Maier R., Vartanian J.P., Bocharov G., Jung V., Fischer U., et al. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature.* 2002; 418(6894): 144. <https://doi.org/10.1038/418144a>
 15. Chen J., Dang Q., Unutmaz D., Pathak V.K., Maldarelli F., Powell D., et al. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J. Virol* 2005; 79(7): 4140–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4140-4149.2005>
 16. Bobkov A.F., Kazenova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol.* 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
 17. Schlösser M., Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., et al. HIV-1 sub-subtype A6: Settings for normalised identification and molecular epidemiology in the Southern Federal District, Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>
 18. Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O., et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS.* 1998; 12(14): 1907–19. <https://doi.org/10.1097/00002030-199814000-00023>
 19. Lebedev A., Pasechnik O., Ozhmegova E., Antonova A., Blokh A., Grezina L., et al. Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0241269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241269>
 20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 21. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Available at: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
 22. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. HIVdb Program: Mutations Analysis. Available at: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>
 23. Gottfried B. A comparative study on linear and region based diagrams. *J. Spat. Inf. Sci.* 2015; (10): 3–20.
 24. Lapovok I.A., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kireev D.E. The study of dual HIV infection prevalence in Russia. *Infektsionnye bolezni.* 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148> (in Russian)
 25. Los Alamos National Laboratory. RIP: Recombinant Identification Program. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>
 26. Pasechnik O.A., Blokh A.I. The prevalence of HIV recombinant forms in Russia and countries of the CIS: systematic review and metaanalysis. *Infektsiya i immunitet.* 2018; 8(2): 127–38. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138> (in Russian)
 27. Federal AIDS Center. Russian database. HIVDR in naive patients; 2020. Available at: <http://www.hivrossia.info/wp-content/uploads/2020/12/2020-Rossiyskaya-baza-dannyh-LU-VICH-u-navinyh-patsientov.pdf> (in Russian)
 28. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH infektsiya i immunosupressii.* 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90> (in Russian)
 29. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A., et al. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2022; 99(1): 28–37. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-216> (in Russian)
 30. Hung M., Tokarsky E.J., Lagpacan L., Zhang L., Suo Z., Lansdon E.B. Elucidating molecular interactions of L-nucleotides with HIV-1 reverse transcriptase and mechanism of M184V-caused drug resistance. *Commun. Biol.* 2019; 2: 469. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0706-x>
 31. De Luca A., Giambenedetto S.D., Trotta M.P., Colafigli M., Prospero M., Ruiz L., et al. Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(11): 1645–53. <https://doi.org/10.1086/522231>
 32. Lanier E.R., Givens N., Stone C., Griffin P., Gibb D., Walker S., et al. Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. *HIV Med.* 2004; 5(6): 394–9. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2004.00243.x>
 33. Hu Z., Giguel F., Hatano H., Reid P., Lu J., Kuritzkes D.R. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006; 80(14): 7020–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.02747-05>
 34. Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse-transcriptase inhibitor-resistance mutations. *Future Microbiol.* 2011; 6(3): 295–315. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.7>
 35. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Huang W., Oliveira M., Han Y., Quan Y., et al. Role of the K101E substitution in HIV-1 reverse transcriptase in resistance to rilpivirine and other nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5649–57. <https://doi.org/10.1128/aac.01536-13>
 36. Madrugá J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2007; 370(9581): 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61047-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61047-2)
 37. Archer R.H., Wisniewski M., Bambara R.A., Demeter L.M. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry.* 2001; 40(13): 4087–95. <https://doi.org/10.1021/bi002328a>
 38. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS.* 2014; 28(17): F1–8. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
 39. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH infektsiya i immunosupressii.* 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-9> (in Russian)
 40. Churina M.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovskiy A.P., Grebenkina E.V., et al. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with art failure in Veliky Novgorod. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2017; 9(1): 82–92. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92> (in Russian)
 41. Chen M., Zhu Q., Xing H., Chen H., Jin X., Dong L., et al. The characteristics of pretreatment HIV-1 drug resistance in western Yunnan, China. *Epidemiol. Infect.* 2020; 148: e102. <https://doi.org/10.1017/s095026882000093x>
 42. Cheung K.W., Peng Q., He L., Cai K., Jiang Q., Zhou B., et al. Rapid and simultaneous detection of major drug resistance mutations in reverse transcriptase gene for HIV-1 CRF01_AE, CRF07_BC and subtype B in China using sequenom MassARRAY® system. *PLoS One.* 2016; 11(4): e0153641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153641>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-126>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Сравнительная характеристика завозных случаев классической и геморрагической форм лихорадки денге в 2009–2019 гг.

Сайфуллин М.А.^{1,2}, Зверева Н.Н.¹, Карань Л.С.³, Григорьева Я.Е.³, Акиншина Ю.А.^{2,4}, Ларичев В.Ф.², Шамшева О.В.¹, Базарова М.В.⁵, Сметанина С.В.⁵

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 125367, г. Москва, Россия;

³ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

⁴ЗАО «ЭКОЛаб», 142530, Московская обл., г. Электрогорск, Россия;

⁵ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы», 125310, г. Москва, Россия

Введение. В России в качестве статистической системы учёта заболеваний законодательно утверждена Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), предусматривающая выделение двух форм лихорадки денге – классической и геморрагической (ГЛД). В открытых источниках официальных статистических данных о соотношении форм заболевания не публикуется. Недостаточность сведений о реальном соотношении форм лихорадки денге затрудняет возможность объективной оценки факторов, обуславливающих тяжесть этого заболевания.

Цель – оценка клинико-эпидемиологических особенностей классической и геморрагической лихорадки денге у больных, госпитализированных в 2009–2019 гг. в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Москвы.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное когортное исследование: проанализирована база данных госпитализированных больных, 391 медицинская карта пациентов с диагнозом «лихорадка денге». Оценивались половые, возрастные характеристики, география поездок с учётом предшествующих визитов пациентов в эндемичные регионы, серотип вируса денге. Для определения первичной и повторной инфекции проведён анализ показателей IgG к вирусу денге на 1–5-е сутки заболевания. Для сравнения показателей рассчитывали 95% доверительные интервалы для долей, медианы и интерквартильный размах. Значимость различий между независимыми выборками для оценки качественных характеристик осуществляли при помощи критериев χ^2 , отношения шансов, для оценки количественных характеристик – критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Доля больных лихорадкой денге составила 14,9% от всех госпитализированных с лихорадочными заболеваниями, развившимися после международных поездок. ГЛД диагностирована у 15,7% больных лихорадкой денге. Значимо чаще ГЛД развивалась у женщин, а также у лиц после повторного посещения эндемичных регионов. Но ГЛД также была диагностирована у 10,9% лиц, впервые посещавших тропические страны. Мы не установили значимых различий развития ГЛД в зависимости от возраста и серотипа вируса денге. У ряда пациентов, ранее не выезжавших в эндемичные регионы, были обнаружены IgG к вирусу денге, что может свидетельствовать о предшествующем инфицировании родственными флавивирусами.

Заключение. Установлено, что в наиболее посещаемых россиянами регионах имеет место циркуляция всех серотипов вируса денге с ежегодной сменой преобладающего серотипа.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка денге; туризм; арбовирусы; диагностика; ПЦР, ИФА

Для цитирования: Сайфуллин М.А., Зверева Н.Н., Карань Л.С., Григорьева Я.Е., Акиншина Ю.А., Ларичев В.Ф., Шамшева О.В., Базарова М.В., Сметанина С.В. Сравнительная характеристика завозных случаев классической и геморрагической форм лихорадки денге в 2009–2019 гг. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(4): 322–330. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-126>

Для корреспонденции: Сайфуллин Мухаммад Абдулфаритович, канд. мед. наук, доцент кафедры инфекционных болезней у детей педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия. E-mail: dr_saifullin@mail.ru

Участие авторов: Сайфуллин М.А. – идея, создание базы данных, сбор информации, написание статьи, статистическая обработка; Зверева Н.Н. – идея, написание статьи, редактирование текста; Карань Л.С. – проведение ПЦР-исследований, редактирование текста; Григорьева Я.Е. – проведение ПЦР-исследований; Ларичев В.Ф. – проведение ИФА, редактирование текста; Акиншина Ю.А. – проведение ИФА, редактирование текста; Шамшева О.В. – написание статьи, редактирование текста; Базарова М.В. – организация сбора данных, редактирование текста; Сметанина С.В. – организация сбора данных, редактирование текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Благодарность. Авторы исследования благодарны коллективу ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» за помощь в сборе материала.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России (протокол №1 заседания от 20.03.2014).

Поступила 01.07.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-126>

Characteristics of imported cases of Dengue fever and hemorrhagic Dengue fever in 2009–2019

Mukhammad A. Sayfullin^{1,2}, Nadezda N. Zvereva¹, Luidmila S. Karan³, Yana E. Grigoreva³, Yulia A. Akinshina^{2,4}, Victor F. Larichev², Olga V. Shamsheva¹, Marina V. Bazarova⁵, Svetlana V. Smetanina⁵

¹Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

²Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

³Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;

⁴CJSC "EcoLab", 142530, Elektrogorsk, Moscow region, Russia;

⁵City Infectious Clinical Hospital No. 1, 125367, Moscow, Russia

Introduction. In Russia, the approved morbidity statistics system is represented by the International Classification of Diseases of the 10th revision (ICD-10). This classification provides two forms of dengue fever (DF): dengue fever (A90) and hemorrhagic dengue (A91). Official statistics on the ratio of forms of DF is not published in open sources and this lack of information about the real ratio of the forms of DF makes it difficult to objectively assess the factors that determine the severity of this disease.

The aim: compare the clinical and epidemiological features of dengue fever and hemorrhagic dengue fever in patients hospitalized in 2009–2019 to the City Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow.

Materials and methods. A retrospective cohort study. We analyzed the patient database and reviewed 391 medical records of patients with diagnosed dengue fever. We compared gender, age characteristics, travel geography including information about previous visits of patients to endemic regions and dengue virus serotype. To determine the primary and re-infection rate, an analysis of IgG for the dengue virus was carried out on days 1–5 of the disease. To compare indicators, 95% confidence intervals for proportions, medians, and interquartile ranges were calculated. The significance of differences between independent samples for assessing qualitative characteristics was carried out using the criteria χ^2 , the odds ratio. To assess the quantitative characteristics, the Mann-Whitney test was used. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results. The proportion of patients with dengue fever was 14.9% of all hospitalized with febrile illnesses that developed after international travel. Hemorrhagic dengue fever (DHF) was diagnosed in 15.7% of patients with dengue fever. DHF developed significantly more often in women, as well as in those who had history of repeated visits to endemic regions. However, DHF was also diagnosed in 10.9% of first-time travelers to tropical countries. We did not find significant differences in the rates of DHF development depending on age and dengue virus serotype. In a number of patients who had not previously traveled to endemic regions, IgG to the dengue virus were detected, which may indicate a previous infection with related flaviviruses.

Conclusion. It has been established that in the regions most visited by Russians, there is a circulation of all serotypes of the dengue virus with an annual change in the predominant serotype.

Keywords: dengue fever; hemorrhagic; tourism; arboviruses; diagnostics; PCR; MAC-ELISA

For citation: Sayfullin M.A., Zvereva N.N., Karan L.S., Grigoreva Ya.E., Akinshina Yu.A., Larichev V.F., Shamsheva O.V., Bazarova M.V., Smetanina S.V. Characteristics of imported cases of Dengue fever and hemorrhagic Dengue fever in 2009–2019. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 322-330. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-126>

For correspondence: Mukhammad A. Sayfullin, Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Infectious Diseases in Children, Faculty of Pediatrics Pirogov Russian National Research Medical University, Sen. of laboratory of biology and indication of arbovirus infections Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: dr_saifullin@mail.ru

Information about the authors:Sayfullin M.A., <https://orcid.org/0000-0003-1058-3193>Zvereva N.N., <https://orcid.org/0000-0003-2699-0439>Karan L.S., <https://orcid.org/0000-0002-5927-460X>Grigoreva Ya.E., <https://orcid.org/0000-0001-9016-9923>Akinshina Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>Larichev V.F., <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>Shamsheva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-6033-6695>Bazarova M.V., <https://orcid.org/0000-0001-7322-7896>Smetanina S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3763-697X>

Contribution: Sayfullin M.A. – idea, database projecting, data collecting, article writing, statistics; Zvereva N.N. – idea, article writing, article revision; Karan L.S. – PCR research, article revision; Grigoreva Ya.E. – PCR research; Larichev V.F. – ELISA research, article revision. Akinshina Yu.A. – ELISA research, article revision; Shamsheva O.V. – article writing, revision; Bazarova M.V. – organization of data collection, article revision; Smetanina S.V. – organization of data collection, article revision.

Funding. The research was funded by the state budget.

Acknowledgement. The authors of the study are grateful to the staff of GBUZ ICH No. 1 of the Moscow Department of Health for their help in collecting the material.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the The D. I. Ivanovskiy Institute of Virology, protocol №1 dated 20.03.2014.

Received 01 July 2022

Accepted 11 August 2022

Published 31 August 2022

Введение

Первый завозной случай лихорадки денге (ЛД) в Российской Федерации был зарегистрирован в 2002 г. [1]. Единичные импортированные случаи были верифицированы в последующие 10 лет. После введения в 2012 г. официальной регистрации ЛД за 9 лет было установлено 1618 случаев заболевания. В 2019 г. 415 случаев ЛД наблюдались в 48 из 85 субъектов Российской Федерации, из них 126 (30,4%) в Москве [2] (рис. 1).

В России в качестве статистической системы учёта заболеваний законодательно утверждена¹ Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), предусматривающая выделение двух форм ЛД – классической (КЛД, А90) и геморрагической (ГЛД, А91). В открытых источниках официальных статистических данных о соотношении форм заболевания не публикуется. Информация о случаях ГЛД в России, в том числе о двух летальных в Москве и Новосибирске, представлена в научных публикациях [3–7]. Недостаточность сведений о реальном соотношении форм ЛД затрудняет возможность объективной оценки факторов, обуславливающих тяжесть этой инфекции. При оказании медицинской помощи больным ЛД рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) стандартный турникет-тест [5, 7] используется не всегда или же он заменяется на нестандартные провокационные пробы [7, 8].

Развитие ГЛД обычно связывают с антителозависимым усилением инфекции (АЗУИ), согласно концепции С. Холстеда развивающимся при вторичной гетерологичной инфекции денге или первичной инфекции у людей, пассивно получивших специфические антитела, в том числе у младенцев, родившихся от серопозитивных матерей [9, 10]. Описанные в литературе случаи повторного заражения гомологичным вирусом денге [11] не выглядят убедительными и требуют дальнейших исследований. Положение о развитии ГЛД при повторном заражении заложено и в клинических рекомендациях «Лихорадка денге у взрослых», опубликованных в 2014 г. [12]. Помимо этого, в настоящее время рассматриваются и другие факторы развития ГЛД: отдельные серотипы DENV [13–15], пол, раса, генетические особенности человека [16–18]. Таким образом, в основе тяжёлых форм заболевания могут лежать различные причины, возможно, приводящие к высокой виремии, высвобождению воспалительных цитокинов, поражению эндотелия, что может определять тяжесть и прогноз заболевания [10, 19, 20].

Цель нашей работы заключалась в оценке клинико-эпидемиологических особенностей КЛД и ГЛД у больных, госпитализированных в 2009–2019 гг. в Инфекционную клиническую больницу № 1 (ИКБ № 1) г. Москвы.

Материалы и методы

Дизайн исследования: ретроспективное когортное исследование.

Материалы: База данных пациентов (создана авторами на платформе MS Access). Медицинские карты пациентов, госпитализированных в ИКБ № 1 с 2009 по 2019 г.

¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 27 мая 1997 г. № 170 «О переходе органов и учреждений здравоохранения Российской Федерации на Международную статистическую классификацию болезней и проблем, связанных со здоровьем, X пересмотра».

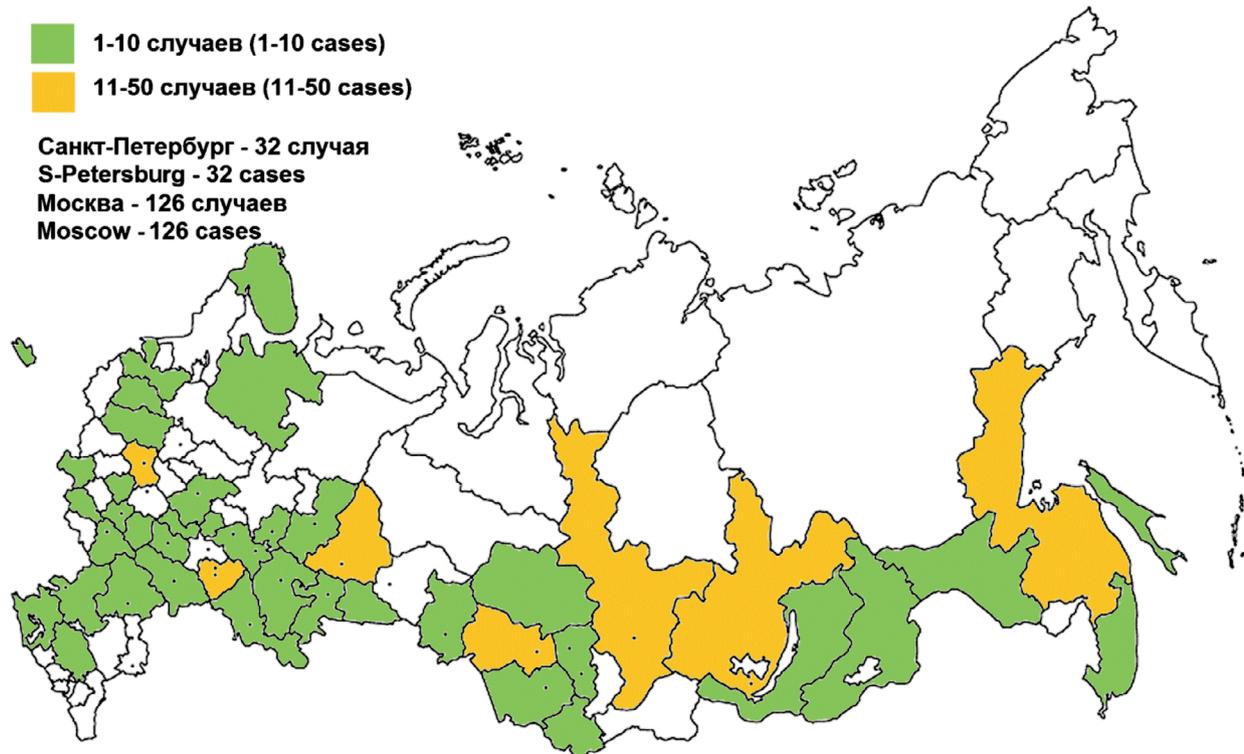


Рис. 1. Заболеваемость лихорадкой денге в субъектах Российской Федерации в 2019 г. (по данным Роспотребнадзора).

Fig. 1. Distribution of cases of dengue fever in the Russian Federation in 2019 (according Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing).

Критерии включения: Медицинские карты пациентов, госпитализированных в ИКБ № 1 с развитием заболевания в течение 21 дня после выезда за границу России. Из этой группы были отобраны карты пациентов с лабораторно подтверждённым диагнозом ЛД. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов². Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России (протокол №1 заседания от 20.03.2014).

Методы специфической диагностики: Антитела класса М к вирусу денге выявляли при помощи зарегистрированного в России набора реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и чикунгунья в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чик». Тест-система позволяет выявлять группоспецифические антитела ко всем четырём серотипам вируса денге. Специфические IgG к вирусу денге выявляли с использованием экспериментального набора ИФА-IgG лаборатории биологии и индикации арбовирусов Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии (НИЦЭМ) имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи.

Выявление рибонуклеиновой кислоты вируса денге и определение типа вируса проводили с использова-

нием экспериментальных и впоследствии зарегистрированных наборов реагентов «АмплиСенс Dengue virus-FL» и «АмплиСенс Dengue virus type-F1» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Диагноз ГЛД устанавливался на основании критериев ВОЗ 1997 г. [20]. При этом учитывались возраст больных, пол, посещение эндемичных по ЛД регионов, контакты с комарами, наличие специфических IgG в первые 5 дней от начала заболевания, результаты генотипирования вируса денге.

Статистическую обработку проводили с помощью программ MS Excel и IBM SPSS Statistics 23.0. Рассчитывали 95% доверительные интервалы (ДИ) для долей на основе bootstrap. Оценку распределения данных делали при помощи критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Для непараметрических показателей рассчитывались медиана и интерквартильный размах. Проверку гипотезы о значимости различий между независимыми выборками осуществляли при помощи критериев χ^2 , отношение шансов (OR) применяли для оценки качественных характеристик, U-критерий Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса – для оценки количественных характеристик. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Общая характеристика больных

За период 2009–2019 гг. в ИКБ № 1 было отобрано 2632 медицинские карты пациентов с лихорадоч-

²Стандартная форма согласия на малоинвазивные манипуляции, забор биологического материала и обработку персональных данных оформлялась при госпитализации пациента.

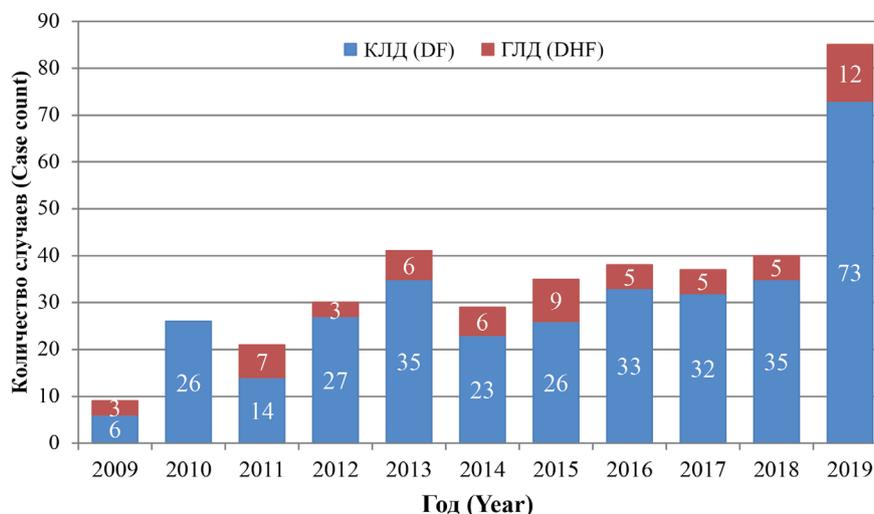


Рис. 2. Число случаев лихорадки денге, диагностированных в Инфекционной клинической больнице № 1 г. Москвы в 2009–2019 гг.

Fig. 2. The number of cases of dengue fever diagnosed in city Infectious Clinical Hospital (Moscow) in 2009–2019.

ными заболеваниями, развившимися в течение 21 дня после посещения зарубежных стран. У 391 из них (14,9%) был установлен диагноз ЛД, в том числе КЛД у 330 (84,3%), ГЛД I–II степени у 57 (14,6%), ГЛД III–IV степени у 4 (1,1%). Среди больных ЛД было 208 (53,2%) женщин.

В течение последних 10 лет отмечалась ежегодная стабильная регистрация по 20–40 завозных случаев ЛД, однако в 2019 г. произошёл значительный рост числа больных, что, вероятно, связано с повышением заболеваемости в ряде стран Юго-Восточной Азии, а также увеличением на 18,9% числа выездов россиян в зарубежные страны в сравнении с прошлыми годами³. В различные годы наблюдения соотношение числа случаев ГЛД и КЛД составляло от 0 до 33,3%, ГЛД выявлена у 15,7% от общего числа больных (рис. 2).

Возраст пациентов составил от 1 до 65 лет с медианой 30 лет [26; 38], среди них было 16 (4,1%) детей в возрасте 1–18 лет, из них ГЛД установлена у одной девочки 9 лет. Медиана возраста у больных КЛД составила 30 лет [26; 37], больных ГЛД – 31 год [26; 38]. ($p_U > 0,05$). ГЛД диагностирована у одного ребенка. В связи с малым количеством наблюдений в детской группе статистический анализ различий частоты ГЛД между детьми и взрослыми не проводился.

Среди больных ГЛД отмечалось значительное преобладание женщин – 43 (70,5%; 95% ДИ 58,7–81,4), тогда как в группе КЛД женщин было 165 (50%; 95% ДИ 43,8–54,5), $p_{\chi^2} = 0,003$, OR = 2,45 (95% ДИ 1,4–4,4).

Больные ЛД поступали в стационар в течение всего года, значительно чаще в январе (15,3%), реже – в октябре (3,8%).

113 (28,4%) больных были госпитализированы на 1–3-и сутки от начала заболевания, 215 (55%) – на 4–6-е, 52 (13,3%) – на 7–9-е и 11 (2,8%) – на 10-е сутки и более от момента появления первых симптомов заболевания.

Ассоциация случаев заражения с посещением эндемичных регионов

Нами установлена причинная связь заболевания с поездками в 23 тропические страны: 373 (95,4%) были связаны с посещением Юго-Восточной и Южной Азии, в том числе Таиланда – 223 (57%), Индонезии – 68 (17,4%), Вьетнама – 36 (9,2%), Мальдивской Республики – 15 (3,8%), Индии – 13 (3,3%). В странах Западного полушария инфицировались 12 (3,1%) человек, в том числе 7 – в Доминиканской Республике, 6 (1,5%) – в странах Африки.

Укусы комаров во время поездок отмечали 277 (70,8%) больных, 60 (15,3%) отрицали контакты с любыми насекомыми, 54 (13,8%) отмечали наличие комаров, но не были уверены в нанесённых ими укусах.

Длительность пребывания в эндемичном регионе, установленная в 360 случаях, варьировала от 3 дней до 2 лет: у 86 (23,8%) – от 3 до 10 дней, у 234 (65%) – 11–20 дней, у 26 (7,2%) – 21–30 дней, и 14 (3,9%) пациентов сообщили о более длительном или постоянном проживании, медиана продолжительности пребывания в эндемичном районе составила 15 дней [11; 16].

Среди общего числа больных 382 (97,6%) имели российское гражданство, 155 (39,6%) посетили тропические регионы впервые, 161 (41,1%) выезжали повторно, в том числе это были граждане Индии (2), Вьетнама (4), Анголы, Перу, Таиланда (по одному). Указание на ранее перенесённую ЛД было у двоих граждан Вьетнама. У 75 (19,2%) пациентов не было анамнестических сведений о поездках, достаточных для оценки.

После первичного посещения эндемичного региона ГЛД развилась у 18 пациентов из 173 (10,9%), при повторном посещении – у 35 из 161 (22,3%), $p_{\chi^2} = 0,007$, OR = 2,34 (95% ДИ 1,26–4,8) (табл. 1).

Максимальный инкубационный период заболевания составил 14–15 суток (определялся сроками появления первых симптомов после возвращения в Россию), минимальные и средние сроки инкубации

в связи с отсутствием установленной связи между укусами комаров и сроками начала заболевания определить не удалось.

Показатели специфических IgM- и IgG-антител у больных лихорадкой денге

Методами ИФА IgM и ИФА IgG с четырёхвалентным антигеном вируса денге были обследованы 26 сывороток, взятых на 2–5-е сутки от начала заболевания (у 22 от пациентов с КЛД, у 4 – с ГЛД). Во всех пробах были обнаружены IgM в диагностических титрах, 1 : 100 – 1 : 6400. IgG выявлялись у 9 человек (34,6%): 3 больных ГЛД и 6 (27,3%) – КЛД. У 5 из них (3 – ГЛД, 2 – КЛД) в анамнезе отсутствовали данные о предыдущих выездах в эндемичные регионы (табл. 2). Из 17 IgG-негативных пациентов ГЛД развилась у одной женщины, ранее посещавшей эндемичные регионы.

Зависимость формы заболевания от серотипа вируса

В результате обследования плазмы крови 246 пациентов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) у 244 был установлен серотип вируса: DENV-1 – 121 (49,5%), DENV-2 – 77 (31,5%), DENV-3 – 30 (12,3%), DENV-4 – 15 (6,1%); у одного пациента была обнаружена коинфекция DENV-1 и DENV-2. У двух пациентов, госпитализированных на 4-е (ГЛД) и 8-е (КЛД)

сутки заболевания, результат ПЦР-исследования был отрицательным. В различные годы соотношение вариантов значительно варьировало с преобладанием DENV-1 или DENV-2.

Каждый из серотипов вируса денге вызывал обе формы заболевания, однако в соотношении его форм имелись различия: наибольшая доля ГЛД приходилась на DENV-3 (табл. 3), статистически значимых различий зависимости долей ГЛД при различных серотипах вируса нами не установлено ($p_{kw} = 0,1$). Этиологического значения вирусов денге в развитии первичных и вторичных случаев ЛД также не установлено.

Соотношение форм заболевания после возвращения из гиперэндемичных районов Юго-Восточной Азии

ГЛД была диагностирована после посещения 9 стран, при этом 31 случай (51%) после поездки в Таиланд, 12 (19,6%) – в Индонезию, 7 (11,5%) – во Вьетнам, 5 (8,2%) – в Мальдивскую Республику. Единичные завозы были из Индии, Мьянмы, Перу, Доминиканской Республики. Таким образом, 96,7% ГЛД были зарегистрированы после посещения стран Южной и Юго-Восточной Азии. Доля ГЛД в странах с 10 заболевшими и более составляла от 13,9% (95% ДИ 9,5–18,9) в Таиланде до 19,4% (95% ДИ 7,5–33,3) во Вьетнаме. ГЛД, помимо прочего, была диагностирована у двух граждан Вьетнама, ранее перенесших ЛД. Статистически значи-

Таблица 1. Частота развития классической и геморрагической форм лихорадки денге в зависимости от кратности посещения эндемичных регионов

Table 1. The frequency of development of DF and DHF depending on the frequency of visits to endemic regions

Диагноз Diagnosis	Количество (%; 95% ДИ) Visit count (%; 95% CI)	
	Первичное посещение First visit	Повторное посещение Return visit
Классическая Dengue fever (DF)	138 (89,1%; 84,3–93,7)	126 (77,6%; 71,3–83,6)
Геморрагическая Dengue Hemorrhagic fever (DHF)	17 (10,9%; 6,3–15,7)	35 (22,4%; 16,4–28,7)

Таблица 2. Значение фактора наличия специфических IgG-антител в ранний период заболевания (2–5 суток)

Table 2. The value of the factor of the presence of specific IgG antibodies in the early period of the disease (2–5 days)

Пол, возраст Gender, Age	Повторное посещение эндемичного региона Return visit in endemic region	Форма заболевания Diagnosis	День болезни Diseases day	Обратная величина титра Reciprocal value of the titer	
				IgG	IgM
Ж (F), 36	Да (Yes)	КЛД (DF)	2	1600	200
М (M), 41	Да (Yes)	КЛД (DF)	3	100	100
Ж (F), 29	Нет (No)	ГЛД (DHF)	4	100	100
Ж (F), 26	Нет (No)	КЛД (DF)	5	200	100
Ж (F), 20	Нет (No)	КЛД (DF)	5	3200	100
Ж (F), 27	Нет (No)	ГЛД (DHF)	5	200	800
М (M), 31	Да (Yes)	КЛД (DF)	5	12 800	800
Ж (F), 23	Нет (No)	ГЛД (DHF)	5	100	1600
М (M), 30	Да (Yes)	КЛД (DF)	5	100	6400

мых различий в соотношении форм заболевания между странами с количеством заболевших более 10 человек мы не установили ($p_{\chi^2} = 0,221$).

Этиологическое значение серотипа DENV-1 было установлено в 49,5% случаев, вместе с тем в различных гиперэндемичных странах его доля колебалась от 33,3 до 68,0%, при этом во всех странах с 10 и более госпитализированными пациентами выявлялись все 4 серотипа в различных соотношениях (рис. 3).

Многолетние наблюдения за госпитализированными пациентами, вернувшимися из Таиланда, показали, что доминирующее значение серотипов из одного и того же региона носило непостоянный характер: значительное преобладание циркуляции DENV-1 наблюдалось в 2013 и 2019 гг., в 2014 г. – DENV-3, в 2018 г. – DENV-2 (рис. 4).

Обсуждение

До возникновения пандемии COVID-19 в России отмечалась стойкая тенденция к росту числа верифицированных завозных случаев ЛД. За 10 лет наблюдений количество случаев этой инфекции увеличилось от единичных до превышающих показатели ряда эндемичных для России природно-очаговых инфекций. Данная тенденция была связана с возрастанием международного туризма, а также внедрением в практику методов специфической диагностики. Завозной характер случаев ЛД, в отличие от эндемичных регионов, предопределяет такие особенности этой инфекции в России, как сезонность,

возрастной состав заболевших, значительно меньшую долю детей, сравнительную редкость случаев неблагоприятного течения болезни (два летальных случая за всё время наблюдений). Известно, что первичное заражение одним из четырёх вирусов денге приводит, как правило, к развитию классической формы заболевания. Однако мы наблюдали летальный случай после первого посещения эндемичного по ЛД региона [2].

По нашим данным, повторное посещение эндемичного региона является фактором повышенного риска развития ГЛД, в большинстве случаев характеризующейся снижением количества тромбоцитов, положительным турникет-тестом и (или) самостоятельно прекращающимися лёгкими спонтанными кровотечениями. В пользу патогенетического значения антителозависимого усиления инфекции при ГЛД свидетельствует большая частота обнаружения IgG у пациентов на ранних сроках заболевания. Для статистически обоснованных выводов по этому вопросу требуется проведение дополнительных исследований. Тем не менее отсутствие IgG у одного пациента с ГЛД в начальном периоде болезни может свидетельствовать о первичной инфекции. Наличие группоспецифических IgG на ранних сроках заболевания у не выезжавших в эндемичные регионы может быть связано с предшествующим инфицированием родственными флавивирусами (Западного Нила, клещевого энцефалита и др.) или вакцинацией против клещевого энцефалита.

Нами не установлена зависимость формы заболевания от конкретного серотипа DENV, но продемонстри-



Рис. 3. Соотношение серотипов вируса денге у больных, прибывших из Таиланда, Индонезии и Вьетнама.

Fig. 3. The ratio of dengue virus serotypes in patients arriving from Thailand, Indonesia and Vietnam.

Таблица 3. Соотношение случаев классической и геморрагической денге при инфицировании различными серотипами

Table 3. The ratio of cases of DF and DHF infected of different DENV serotypes (count, percent, 95%CI)

Диагноз Diagnosis	Количество случаев (%; 95% ДИ) Case count (%; 95% CI)			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Классическая Dengue fever (DF)	19 (15,6%; 9,7–21,9)	10 (12,1%; 5,5–20,6)	9 (30,0%; 14,8–48,1)	1 (6,7%; 0–22,7)
Геморрагическая Hemorrhagic Dengue fever (DHF)	103 (84,4%; 78,1–90,3)	68 (87,9%; 79,4–89,5)	21 (70%; 51,9–85,2)	14 (93,3%; 77,3–100)

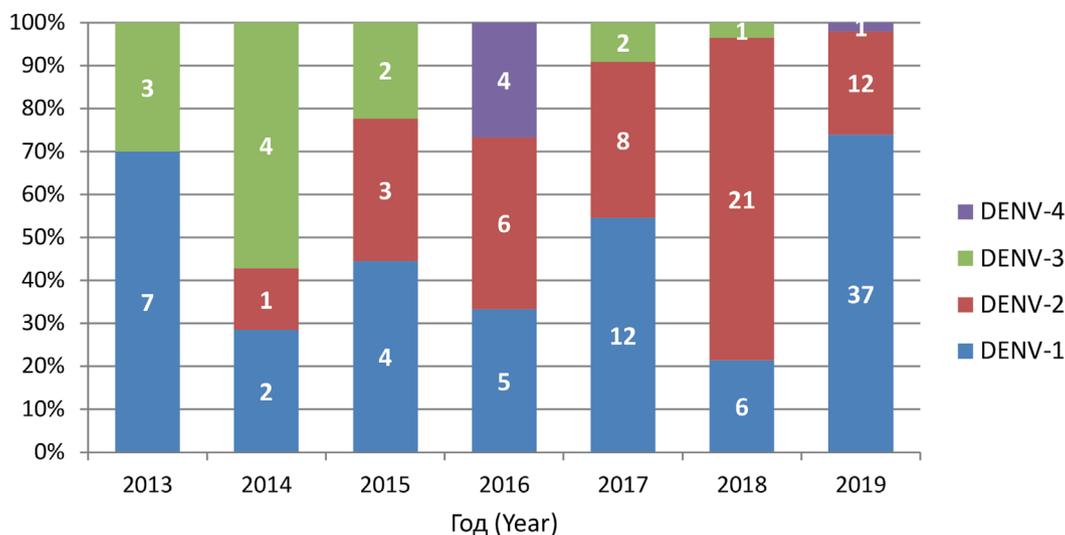


Рис. 4. Соотношение серотипов вируса денге у пациентов, инфицированных в Таиланде в 2013–2019 гг.
Fig. 4. The ratio of dengue virus serotypes in patients infected in Thailand 2013–2019.

рована циркуляция всех четырех серотипов в гиперэндемичных, наиболее популярных среди российских туристов странах. Кроме того, установлено, что в регионах, эндемичных по ЛД, происходит постоянное изменение соотношения активности циркуляции различных вирусов денге, что не исключает возможности повторного заражения гетерологичным вирусом при повторном посещении той же географической территории. Поэтому перед последующими поездками реконвалесценты денге в обязательном порядке должны быть уведомлены о возможных рисках, необходимых превентивных мерах профилактики и немедленном обращении за медицинской помощью при любом лихорадочном заболевании, развившемся во время или в течение двух недель после поездки в эндемичные регионы.

Выводы

Установлено, что женщины в большей степени подвержены риску заболевания геморрагической формой ЛД, что соответствует результатам предшествующих исследований.

Повторное посещение эндемичных регионов повышает риск развития ГЛД, однако данная форма заболевания может наблюдаться и у лиц после первичного посещения эндемичных тропических стран.

Обнаружение гетерологичных IgG в ранние сроки заболевания у лиц, не посещавших эндемичные по ЛД регионы, вероятно, может быть результатом ранее предшествующего инфицирования родственными вирусами или вакцинацией.

Ограничения исследования

В связи с тем, что исследование было ретроспективным и мы проводили работу с документированными данными, сроки забора клинического материала у госпитализированных пациентов не были достаточно стандартизированы. У небольшой части пациентов

из-за поздних сроков обращения и госпитализации в исследованиях было ограничено количество биологического материала, полученного в первые сутки заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; (1): 35–8.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». М.; 2021.
3. Сайфуллин М.А., Келли Е.И., Базарова М.В., Ларичев В.Ф., Карань Л.С., Акиншина Ю.А. и др. Случай лихорадки денге с летальным исходом. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(2): 49–51.
4. Дьячков А.Г., Лиознов Д.А., Дорошкевич В.В. Случай геморрагической лихорадки, вызванный вирусом денге. *Журнал инфектологии*. 2013; 5(3): 71–3. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2013-5-3-71-73>
5. Сафонов А.Д. Случай завоза геморрагической лихорадки денге в Омск. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; (1): 49–51.
6. Надеев А.П., Мальцева Ю.Г., Шишкина Е.Ю., Поротникова Е.В., Хохлова Н.И. Лихорадка денге с летальным исходом. *Архив патологии*. 2020; 82(1): 52–5. <https://doi.org/10.17116/patol20208201152>
7. Нечаев В.В., Яровая И.И., Каченя Г.В., Догужиева Е.В., Бунтовская С.С., Егорихина А.Д. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика завозной тропической лихорадки денге. *Журнал инфектологии*. 2021; 13(1): 78–85. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85>
8. Хохлова Н.И., Краснова Е.И., Позднякова Л.Л. Клиническая и лабораторная диагностика лихорадки денге у туристов. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(1): 65–9. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-1-65-69>
9. ВОЗ. Информационный бюллетень. Денге и тяжелая денге. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
10. Halstead S. Recent advances in understanding dengue. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1279. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19197.1>
11. Waggoner J.J., Balmaseda A., Gresh L., Sahoo M.K., Montoya M., Wang E., et al. Homotypic dengue virus reinfections in Nicaragua

- guan children. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(7): 986–93. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw099>
12. Лихорадка денге у взрослых. Клинические рекомендации. Утверждены решением Пленума правления Национального научного общества инфекционистов 30 октября 2014 года. Available at: https://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/Lih_Denge_adult.pdf
 13. Holmes E.C., Twiddy S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(1): 19–28. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00004-2)
 14. Simmons C.P., Farrar J.J., Nguyen V.C., Wills B. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(15): 1423–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
 15. Huy N.T., Van Giang T., Thuy D.H., Kikuchi M., Hien T.T., Zamora J., et al. Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(9): 2412. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002412>
 16. Николаева Л.И., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Дедова А.В., Гришечкин А.Е., Васильев А.В. и др. Анализ возможного влияния генетических факторов пациентов на течение инфекции, вызванной вирусом лихорадки денге. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2022; 11(1): 8–14. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2022-11-1-8-14>
 17. Bhatt P., Sabeena S.P., Varma M., Arunkumar G. Current understanding of the pathogenesis of Dengue virus infection. *Curr. Microbiol.* 2021; 78(1): 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>
 18. Xavier-Carvalho C., Cardoso C.C., de Souza Kehdy F., Pacheco A.G., Moraes M.O. Host genetics and dengue fever. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.009>
 19. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva; 1997.
 20. Harapan H., Michie A., Sasmono R.T., Imrie A. Dengue: a minireview. *Viruses.* 2020; 12(8): 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- REFERENCES**
1. Larichev V.F., Sayfullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. Imported cases of arbovirus infections in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2012; (1): 35–8. (in Russian)
 2. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020». Moscow; 2021. (in Russian)
 3. Sayfullin M.A., Kelli E.I., Bazarova M.V., Larichev V.F., Karan' L.S., Akinshina Yu.A., et al. Dengue fever fatal case. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2015; 20(2): 49–51. (in Russian)
 4. D'yachkov A.G., Lioznov D.A., Doroshkevich V.V. Case report of dengue hemorrhagic fever. *Zhurnal infektologii.* 2013; 5(3): 71–3. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2013-5-3-71-73> (in Russian)
 5. Safonov A.D. A case of imported dengue hemorrhagic fever in Omsk. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2012; (1): 49–51. (in Russian)
 6. Nadeev A.P., Mal'tseva Yu.G., Shishkina E.Yu., Porotnikova E.V., Khokhlova N.I. Fatal dengue fever. *Arkhiv patologii.* 2020; 82(1): 52–5. <https://doi.org/10.17116/patol20208201152> (in Russian)
 7. Nechaev V.V., Yarovaya I.I., Kachenya G.V., Doguzhieva E.V., Buntovskaya S.S., Egorikhina A.D., et al. Clinical-epidemiological characteristics delivery cases of tropic dengue fever. *Zhurnal infektologii.* 2021; 13(1): 78–85. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85> (in Russian)
 8. Khokhlova N.I., Krasnova E.I., Pozdnyakova L.L. Clinical and laboratory diagnosis of dengue fever in travelers. *Zhurnal infektologii.* 2015; 7(1): 65–9. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-1-65-69> (in Russian)
 9. WHO. Fact sheets. Dengue and severe dengue. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
 10. Halstead S. Recent advances in understanding dengue. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1279. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19197.1>
 11. Waggoner J.J., Balmaseda A., Gresh L., Sahoo M.K., Montoya M., Wang E., et al. Homotypic dengue virus reinfections in Nicaraguan children. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(7): 986–93. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw099>
 12. Dengue fever in adults. Clinical recommendations. Approved by the decision of the Plenum of the Board of the National Scientific Society of Infectious Diseases on October 30, 2014. Available at: https://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/Lih_Denge_adult.pdf (in Russian)
 13. Holmes E.C., Twiddy S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(1): 19–28. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00004-2)
 14. Simmons C.P., Farrar J.J., Nguyen V.C., Wills B. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(15): 1423–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
 15. Huy N.T., Van Giang T., Thuy D.H., Kikuchi M., Hien T.T., Zamora J., et al. Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(9): 2412. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002412>
 16. Nikolaeva L.I., Larichev V.F., Sayfullin M.A., Dedova A.V., Grischechkin A.E., Vasil'ev A.V., et al. Analysis of the possible association of patients' genetic factors with course of dengue virus infection. *Infeksionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie.* 2022; 11(1): 8–14. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2022-11-1-8-14> (in Russian)
 17. Bhatt P., Sabeena S.P., Varma M., Arunkumar G. Current understanding of the pathogenesis of Dengue virus infection. *Curr. Microbiol.* 2021; 78(1): 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>
 18. Xavier-Carvalho C., Cardoso C.C., de Souza Kehdy F., Pacheco A.G., Moraes M.O. Host genetics and dengue fever. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.009>
 19. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva; 1997.
 20. Harapan H., Michie A., Sasmono R.T., Imrie A. Dengue: a minireview. *Viruses.* 2020; 12(8): 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-127>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Тест-система на основе конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу бешенства животных (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*)

Лобанова В.А.^{1,2}, Царькова К.Н.¹, Богомолова О.А.¹, Матвеева И.Н.¹, Клюкина В.И.¹¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, Россия;²ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, г. Москва, Россия

Введение. Основным направлением профилактики бешенства является вакцинация домашних и диких плотоядных животных. Для рутинной оценки эффективности антирабической вакцинации Международным эпизоотическим бюро (МЭБ) рекомендован иммуноферментный анализ (ИФА). Актуальной задачей остаётся разработка модификаций ИФА с большей диагностической специфичностью (ДС) и чувствительностью (ДЧ). **Цель работы** – конструирование и валидация тест-системы на основе конкурентного ИФА (кИФА) для выявления антител к вирусу бешенства (ВБ).

Материалы и методы. Разработку тест-системы проводили в соответствии с рекомендациями МЭБ. Определяли дозу ВБ для сенсibilизации планшетов, состав блокирующего буфера; оптимальные разведения компонентов; порядок интерпретации результатов ИФА.

Результаты. Повторяемость результатов кИФА в рамках одной лаборатории была удовлетворительной: коэффициент вариации – 7,95–13,61%, коэффициент детерминации (КД) между результатами реакции нейтрализации (FAVN) и кИФА – 0,988, $p < 0,001$. Нижний порог обнаружения антител составил менее 0,02 МЕ/мл. Разработанная тест-система не демонстрировала кросс-реактивности в отношении антител к вирусу чумы плотоядных, вирусу парагриппа, парвовирусу, коронавирусу, аденовирусу собак (I и II серотипа). При исследовании 137 сывороток крови собак ДС и ДЧ кИФА составили 83,1 и 94,9% соответственно, КД между результатами кИФА и FAVN – 0,968, $p < 0,001$.

Обсуждение. Диагностикумы для определения уровня антител к ВБ на основе непрямого ИФА недостаточно чувствительны по сравнению с референс-тестами. Оптимальным решением являются варианты кИФА с применением биотинилированных антител. Разработанная тест-система по ДС и ДЧ не уступает коммерческой тест-системе кИФА BioPro ELISA Rabies Ab: ДС 66,7%, ДЧ 94,4%.

Заключение. Таким образом, разработанная тест-система на основе кИФА может быть использована для выявления антител к ВБ в сыворотке крови собак при оценке эффективности программ массовой вакцинации.

Ключевые слова: бешенство; выявление антител; конкурентный иммуноферментный анализ; диагностическая специфичность; диагностическая чувствительность; ROC-анализ

Для цитирования: Лобанова В.А., Царькова К.Н., Богомолова О.А., Матвеева И.Н., Клюкина В.И. Тест-система на основе конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу бешенства животных (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*). *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(4): 331-340. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-127>

Для корреспонденции: Лобанова Варвара Андреевна, аспирант отдела иммунологии Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП), 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, Россия; ассистент кафедры биотехнологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, 127434, г. Москва, Россия. E-mail: varvara.ustinova1995@gmail.com

Участие авторов: Лобанова В.А. – концепция и дизайн исследования, конструирование тест-системы, отбор проб крови у собак, постановка кИФА и FAVN, сбор и статистическая обработка данных, интерпретация результатов, написание текста, утверждение окончательной версии статьи; Царькова К.Н. – отбор проб крови у собак, сбор и статистическая обработка данных, интерпретация результатов, редактирование текста; Богомолова О.А. – сбор и статистическая обработка данных, интерпретация результатов, редактирование текста; Матвеева И.Н. – концепция и дизайн исследования, консультативная помощь; Клюкина В.И. – концепция и дизайн исследования, интерпретация результатов, консультативная помощь, редактирование текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт средств государственного бюджета, в том числе в рамках НИР FZFU-2019-0013 «Провести проблемно-поисковые исследования и разработать новые высокоэффективные и биологически безопасные антирабические вакцины, методы технологического контроля иммуногенности препаратов и тест-системы экспресс диагностики бешенства животных».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 24.06.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-127>

Competitive ELISA test system for the detection of antibodies to the rabies virus in animals (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*)

Varvara A. Lobanova^{1,2}, Kristina N. Tsarkova¹, Olesya A. Bogomolova¹, Irina N. Matveeva¹,
Valentina I. Klyukina¹

¹All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, 141142, Moscow Region, Losino-Petrovsky urb. distr., Russia;

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 127434, Moscow, Russia

Introduction. The main approach to the rabies prevention is the vaccination of domestic and wild carnivores. For the routine evaluation the anti-rabies vaccination effectiveness, World Organization for Animal Health (OIE) recommends various enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

The aim of the study was to design and validate a competitive ELISA (cELISA) test system for the detection of antibodies to the rabies virus (RABV).

Materials and methods. The development of the cELISA was carried out following the OIE recommendations.

Results. The repeatability of the cELISA results within one laboratory was satisfactory (coefficient of variation 7.95–13.61%). The coefficient of determination (CD) between the results of the virus neutralization reaction (FAVN) and cELISA was 0.988, $p < 0.001$. The lower threshold for antibody detection was less than 0.02 IU/ml. The cELISA did not demonstrate cross-reactivity against antibodies to canine distemper virus, parainfluenza virus, parvovirus, coronavirus, and canine adenovirus (types I and II). During the study of 137 dog blood sera, diagnostic specificity (DSp) and diagnostic sensitivity (DSe) for the cELISA were 83.1% and 94.9%, respectively, and CD between the cELISA and FAVN results was 0.968, $p < 0.001$.

Discussion. Indirect ELISA test systems for determining the level of antibodies to RABV are not sensitive enough compared to reference tests, unlike cELISA. The developed test system is not inferior for its DSp and DSe to the commercial cELISA BioPro ELISA Rabies Ab (DSp 66.7%, DSe 94.4%).

Conclusion. The developed cELISA test system can be used to detect antibodies to RABV in the blood serum of dogs for evaluating the effectiveness of mass vaccination programs.

Keywords: rabies; antibodies/analysis; nzyme-linked immunosorbent assay/methods; enzyme-linked immunosorbent assay/veterinary; sensitivity and specificity; ROC curve

For citation: Lobanova V.A., Tsarkova K.N., Bogomolova O.A., Matveeva I.N., Klyukina V.I., Competitive ELISA test system for the detection of antibodies to the rabies virus in animals (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 331-340 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-127>

For correspondence: Varvara A. Lobanova, Postgraduate Student of the Immunology Department, FSBI “All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry”, 141142, Moscow Region, Losino-Petrovsky urb. distr., Russia; Assistant of Biotechnology Department, FSBEI HE “Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy”, 127434, Moscow, Russia. E-mail: varvara.ustanova1995@gmail.com

Information about the authors:

Lobanova V.A., <https://orcid.org/0000-0001-9757-784X>

Tsarkova K.N., <https://orcid.org/0000-0003-0694-9834>

Bogomolova O.A., <https://orcid.org/0000-0001-6442-226X>

Matveeva I.N., <https://orcid.org/0000-0003-0849-2524>

Klyukina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-4295-1424>

Contribution: Lobanova V.A. – research concept and design, cELISA design, taking blood samples from dogs, setting up cELISA and FAVN, statistical data processing, interpretation of the results, writing of the text, approval of the final version of the article; Tsarkova K.N. – taking blood samples from dogs, statistical data processing, interpretation of the results, writing of the text; Bogomolova O.A. – statistical data processing, interpretation of the results, editing of the text; Matveeva I.N. – research concept and design, consultations; Klyukina V.I. – research concept and design, interpretation of research results, consultations, editing of the text.

Funding. The research was funded by the State budget, including within the framework of research work FZ-FU-2019-0013 “To conduct problem-exploratory studies and develop new highly effective and biologically safe anti-rabies vaccines, methods for the technological control of the immunogenicity of drugs and test systems for the rapid diagnosis of animal rabies.”

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

Received 24 June 2022
Accepted 11 August 2022
Published 31 August 2022

Введение

Бешенство (греч. Rabies – безумие) – острое приодно-очаговое заболевание теплокровных животных и человека, характеризующееся поражениями нервной системы и 100% летальным исходом [1]. Ежегодно от бешенства умирают почти 59 000 человек во всём мире. Рабическая инфекция по-прежнему представляет глобальную угрозу для людей и животных, а распространение бешенства собак напрямую увеличивает риск заражения людей при контактах с ними. Российская Федерация на протяжении многих лет является неблагополучной по бешенству животных. Подавляющее большинство случаев выявляют у домашних и диких плотоядных: собак, кошек, енотовидных собак, лис, куниц. Поэтому основным направлением профилактики заболевания на протяжении многих лет остаётся вакцинация домашних и диких животных [2].

Неотъемлемым компонентом контроля эффективности вакцинопрофилактики является определение титров антител к вирусу бешенства (ВБ) в сыворотках крови вакцинированных животных. Для контроля напряжённости поствакцинального иммунитета и определения уровня антител к ВБ Международным эпизоотическим бюро (МЭБ, ОIE) рекомендованы тест-системы на основе реакций нейтрализации вируса в культуре клеток, а также иммуноферментного анализа (ИФА) [1]. Для рутинного исследования большого количества сывороток при оценке эффективности вакцинации обычно применяют непрямой (НИФА) или конкурентный (КИФА) варианты ИФА, при этом НИФА имеет ряд ограничений, в том числе обусловленных недостаточной чувствительностью теста [3]. Биотехнологическим решением проблемы низкой чувствительности тест-системы и универсальности диагностики в отношении образцов от разных видов животных стала разработка методов КИФА [4, 5], в том числе и с применением стрептавидин-пероксидазных конъюгатов [6–8].

Цель работы – конструирование и валидация тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител к ВБ животных.

Материалы и методы

Компоненты для конкурентного ИФА

При постановке КИФА использовали компоненты, полученные в результате предыдущих исследований: концентрированный очищенный препарат культурального ВБ, штамм «Щелково-51», с активностью 1 : 128 в реакции диффузионной преципитации (РДП), 1 : 320 в реакции связывания комплемента (РСК) и 1 : 4000 в НИФА; контрольная антирабическая сыворотка крови собак с концентрацией вируснейтрализующих антител (ВНА) $5,5 \pm 0,26$ МЕ/мл (определена в собственной модификации теста FAVN (fluorescent antibody virus neutralization test) с ВБ штамма «Щелково-51»); биотинилированные поликлональные кроличьи антитела к ВБ с активностью 1 : 128 в РДП, 1 : 160 в РСК, 1 : 12 800 в НИФА (степень биотинилирования антител – в среднем

$5,2 \pm 0,34$ молекулы биотина на 1 молекулу антител) [9, 10].

Исследуемые сыворотки

Сыворотки крови домашних собак, вакцинированных против ВБ в разные периоды времени, были любезно предоставлены ветеринарной клиникой «Зоодоктор» (г. Щёлково) и использованы с согласия владельцев животных. Пул нормальных сывороток от клинически здоровых невакцинированных собак исследовали в собственной модификации теста FAVN с ВБ штамма «Щелково-51» [1], и отрицательно реагирующие сыворотки использовали в качестве отрицательного контроля для КИФА. Все образцы были доставлены в лабораторию при соблюдении температурного режима до 10°C. Для снижения вероятности проявления ложноположительных результатов в КИФА неспецифические термолabile ингибиторы в образцах инактивировали на водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

Конкурентный ИФА

На лунки 96-луночного планшета (Corning, кат. № 3591, США) сорбировали очищенный культуральный ВБ штамма «Щелково-51» в качестве антигена. Для этого в каждую лунку вносили по 100 мкл вируса в концентрации 10 мкг/мл в 50 мМ карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 9,6) и оставляли при 4°C на 12 ч. Затем планшет пятикратно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) (pH 7,2–7,4) с 0,05% Твин 20 (Sigma-Aldrich, CAS № 9005-64-5, pH 7,2) для удаления несвязавшегося антигена и обрабатывали 200 мкл 2% обезжиренного сухого молока (ОСМ) при 37°C в течение 1 ч для блокирования неспецифических реакций. В лунки добавляли положительную контрольную сыворотку с концентрацией ВНА 5, 1 и 0,5 МЕ/мл (SS), отрицательную контрольную сыворотку (SN) или исследуемые сыворотки в разведении 1 : 2 в PBS в объёме 100 мкл, а затем инкубировали при 37°C в течение 1 ч и пятикратно промывали PBS, содержащим 0,05% Твин 20. В лунки добавляли по 100 мкл биотинилированных поликлональных антител к ВБ (разведение 1 : 2048), а затем инкубировали при 37°C в течение 1 ч и пятикратно промывали PBS с 0,05% Твин 20. В лунки добавляли по 100 мкл стрептавидин-пероксидазного конъюгата (Sigma-Aldrich, Prod. № 189733, разведение 1 : 5000), а затем инкубировали при 37°C в течение 1 ч и пятикратно промывали PBS с 0,05% Твин 20. Реакцию образования комплекса «антиген + антитело» визуализировали при добавлении в каждую лунку планшета по 100 мкл тетраметилбензидин-раствора (Sigma-Aldrich, CAS № 54827-17-7, pH 3,4–3,8); инкубировали 20 мин при 20°C, избегая попадания солнечного света на лунки планшета, и останавливали с помощью 50 мкл 1 Н раствора H₂SO₄. Разведения всех компонентов, кроме ВБ, готовили с использованием PBS с 0,05% Твин 20 и 0,2% ОСМ [11].

Оптическую плотность раствора в каждой лунке определяли на спектрофотометре (Sigma, США)

при 450 нм (OD450), для каждой лунки вычисляли процент ингибиции окрашивания (PI) по формуле (1):

$$PI = \frac{OD450 (SN) - OD450 (иссл.)}{OD450 (SN) - OD450 (SS)} \times 100\%, \quad (1)$$

где *OD450 (иссл.)* – OD450 лунки с исследуемой сывороткой, *OD450 (SN)* – OD450 лунки, содержащей отрицательную контрольную сыворотку (SN), *OD450 (SS)* – OD450 лунки, содержащей положительную контрольную сыворотку (SS).

Концентрацию антирабических антител определяли при построении калибровочной кривой на основе PI лунок, содержащих положительную контрольную сыворотку. Поствакцинальный антирабический иммунитет оценивали как протективный, если в сыворотке крови вакцинированных собак содержание ВНА составляло не менее 0,5 МЕ/мл. Результаты кИФА считали действительными при соблюдении следующих условий:

- OD450 отрицательной контрольной сыворотки не менее 1,0;
- разница между OD450 отрицательной и положительной контрольных сывороток не менее 0,8;
- при построении калибровочной кривой наблюдается линейная зависимость между OD450 и концентрацией антител в положительной контрольной сыворотке.

При несоблюдении одного или нескольких из этих условий результаты теста считались недействительными и исследование следовало повторить, предварительно убедившись в корректности осуществления методики, соблюдении мер, исключающих перекрёстную контаминацию лунок и другие типичные ошибки при постановке таких рутинных тестов, как ИФА. При наличии эффекта насыщения (выхода калибровочной кривой OD450 на плато при достижении определённых концентраций ВНА) действительными считали только результаты исследования тех лунок, чьи значения OD450 расположены на участке кривой, отражающей линейную зависимость OD450 от концентрации антител. Результаты лунок, значения которых находятся на горизонтальном участке калибровочной кривой (участок плато), не могут быть корректно интерпретированы, поэтому сыворотки из таких лунок должны быть повторно исследованы в кИФА в разведении 1 : 4.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [12]. Графический анализ выполнен с использованием программного обеспечения R версии 3.5.1.

Результаты

Подбор оптимальных концентраций реагентов для постановки конкурентного ИФА

Разработку иммуноферментной тест-системы на основе кИФА проводили в соответствии с рекомендациями МЭБ – Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021, части 2.2.1, 2.2.4, 2.2.5 [1].

В ходе оптимизации условий постановки кИФА определяли оптимальную дозу вируса для сенсibilизации планшетов, состав блокирующего буфера; оптимальные разведения биотинилированных антител, стрептавидин-пероксидазного конъюгата и исследуемых сывороток; порядок регистрации и интерпретации результатов ИФА.

Оптимальную концентрацию очищенного цельновирионного культурального ВБ штамма «Щелково-51» для иммобилизации на поверхности лунок 96-луночного планшета, биотинилированных кроличьих поликлональных антител к ВБ, а также стрептавидин-пероксидазного конъюгата определяли методом шахматного титрования вируса в концентрациях от 0,2 до 40 мкг/мл, биотинилированных антител – в последовательных двукратных разведениях от 1 : 2 до 1 : 4096 и стрептавидин-пероксидазного конъюгата в разведениях от 1 : 100 до 1 : 10 000 (**рис. 1**). Концентрация очищенного цельновирионного культурального ВБ штамма «Щелково-51» 10 мкг/мл определена в качестве оптимальной для иммобилизации на поверхности 96-луночного планшета при времени экспозиции 12 ч при 4°C (**рис. 1 а, б**). В качестве оптимального определено разведение биотинилированных антител 1 : 2048 (**рис. 1 а, в**), а для стрептавидин-пероксидазного конъюгата это значение составило 1 : 5000 (**рис. 1 б, в**).

Для определения оптимального состава буфера для блокирования неспецифических реакций после сенсibilизации планшетов очищенным ВБ штамма «Щелково-51» сравнивали OD450 лунок при постановке кИФА с использованием следующих блокирующих буферов: 1%, 2% растворы ОСМ (Millipore, Prod. № 70166), 1%, 2%, 3% растворы бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, CAS № 9048-46-8) в PBS. Каждый раствор добавляли в лунки в количестве 200 мкл и инкубировали планшеты при 37°C в течение 1 ч. В кИФА исследовали положительную и отрицательную контрольные сыворотки крови собак с активностью 0,5 и 0,05 МЕ/мл соответственно в 10 повторностях ($n = 10$). По результатам исследований в качестве блокирующего буфера был выбран 2% раствор ОСМ в PBS (**табл. 1**).

Для проведения кИФА в качестве оптимального было определено двукратное разведение исследуемых сывороток (1 : 2). В случаях, когда концентрация антител в сыворотке превышает 10 МЕ/мл, результаты определения PI находятся на горизонтальном участке калибровочной кривой (участок плато) и не могут быть интерпретированы с достаточной точностью. Такие сыворотки дополнительно исследовали в разведении 1 : 4.

Повторяемость результатов конкурентного ИФА в рамках одной лаборатории

Пять образцов сывороток крови собак были протестированы в отделе иммунологии Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности в ходе проведения пяти анализов кИФА в течение 1 недели, при каждом

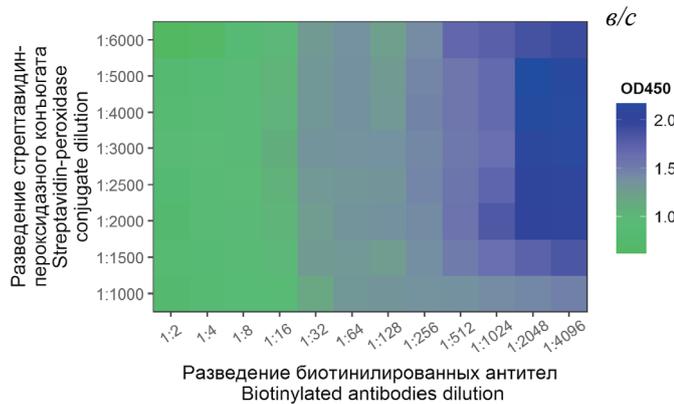
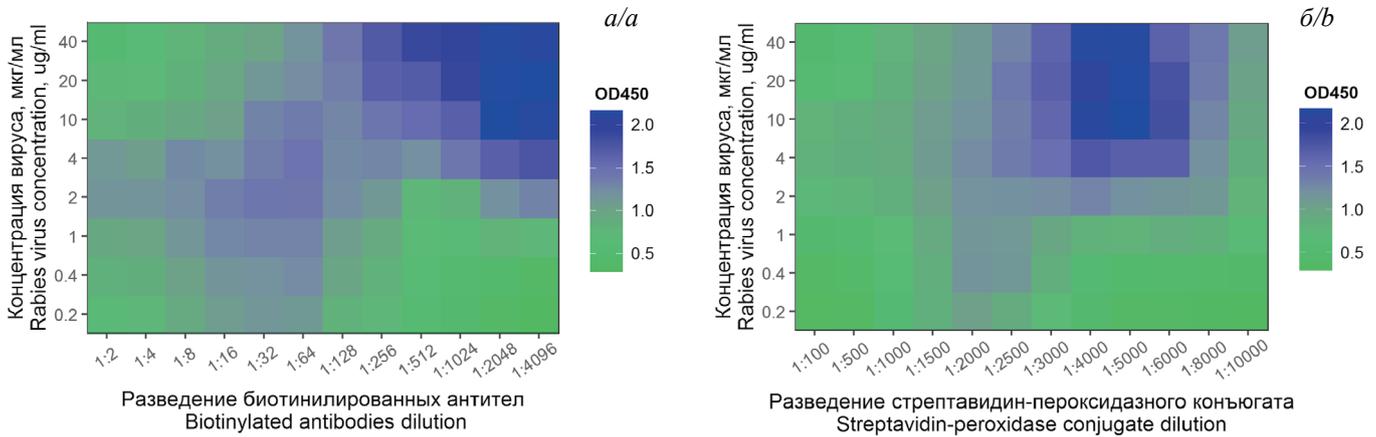


Рис. 1. Результаты шахматного титрования: *a* – вируса бешенства штамма «Щелково-51» и биотинилированных кроличьих антирабических антител; *b* – вируса бешенства штамма «Щелково-51» и стрептавидин-пероксидазного конъюгата; *v* – биотинилированных кроличьих антирабических антител и стрептавидин-пероксидазного конъюгата.

Fig. 1. Checkerboard titration results: *a* – rabies virus strain Schelkovo-51 vs biotinylated rabbit anti-rabies antibodies; *b* – rabies virus strain Schelkovo-51 vs streptavidin-peroxidase conjugate; *c* – biotinylated rabbit anti-rabies antibodies vs streptavidin-peroxidase conjugate.

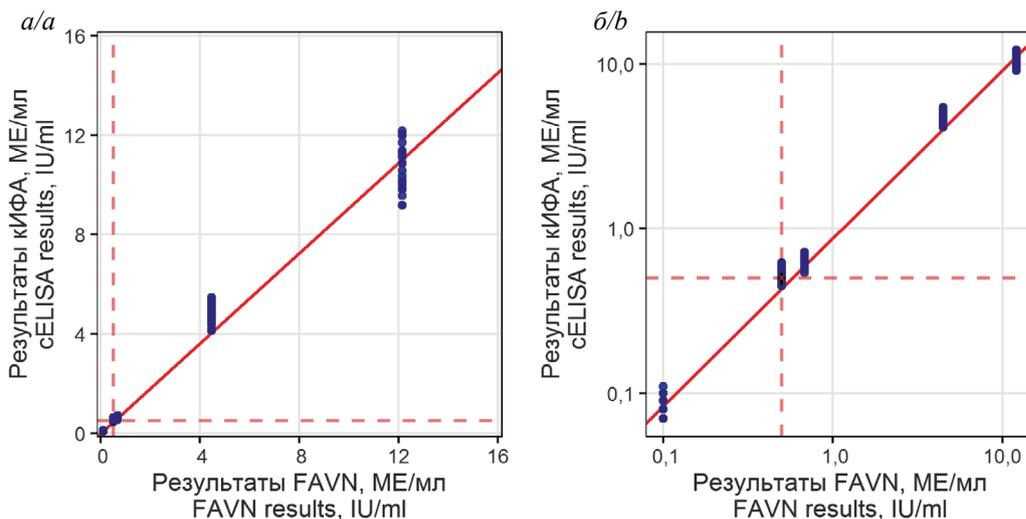


Рис. 2. Корреляция между результатами FAVN и кИФА: *a* – оси X и Y представлены на линейной шкале; *b* – оси X и Y представлены на log₁₀-шкале. Сплошной обозначена линия регрессии. Пунктирные линии обозначают протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл.

Fig. 2. Correlation between FAVN and cELISA results: *a* – X and Y axes are presented in linear scale; *b* – X and Y axes are presented in log₁₀ scale. The solid line indicates the regression line. Dashed lines represent protective antibody level of 0.5 IU/ml.

анализе образец исследовали в четырех повторностях. Таким образом, для каждого из 5 образцов было получено 20 результатов исследования в конкурентном варианте ИФА. Параллельно при каждом анализе тестировали положительную контрольную сыворотку с концентрацией ВНА 5, 1, 0,5, 0,1 МЕ/мл, строили калибровочную кривую и вычисляли концентрацию антител для исследуемых сывороток. Далее для каждой сыворотки рас-

считывали среднюю концентрацию антител, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV) [1]. Для каждой из пяти исследованных сывороток CV составил менее 15%, включая образец с низким уровнем ВНА (образец № 5), что говорит об удовлетворительной повторяемости результатов кИФА (табл. 2). Коэффициент детерминации (R²) между результатами FAVN и кИФА составил 0,988, *p* < 0,001 (рис. 2).

Таблица 1. Влияние блокирующих растворов на результаты конкурентного ИФА, М ± SD

Table 1. Effect of blocking solutions on cELISA results, M ± SD

Раствор, концентрация Solution, concentration	OD450 в кИФА контрольных сывороток с активностью OD450 in cELISA for control sera with activity			Отношение OD450 SN/SP OD450 SN/SP ratio	Пороговый PI* для 0,5 МЕ/мл, % Threshold PI* for 0.5 IU/ml, %
	0,05 МЕ/мл (SN) 0,05 IU/ml (SN)	5 МЕ/мл (SP) 5 IU/ml (SP)	0,5 МЕ/мл 0,5 IU/ml		
ОСМ, 1 % Skim milk powder, 1%	1,98 ± 0,18	0,19 ± 0,05	0,79 ± 0,12	10,41 ± 0,45	67,38 ± 3,78
ОСМ, 2 % Skim milk powder, 2%	2,12 ± 0,23	0,16 ± 0,03	0,76 ± 0,09	13,37 ± 0,42	69,29 ± 3,12
БСА, 1 % Bovine serum albumin, 1%	1,87 ± 0,19	0,22 ± 0,03	0,92 ± 0,13	8,54 ± 0,36	57,78 ± 2,45
БСА, 2 % Bovine serum albumin, 2%	1,84 ± 0,24	0,23 ± 0,05	0,87 ± 0,08	8,07 ± 0,22	60,84 ± 3,08
БСА, 3 % Bovine serum albumin, 3%	2,07 ± 0,16	0,22 ± 0,05	0,82 ± 0,11	9,43 ± 0,34	66,95 ± 2,23

Примечание. кИФА – конкурентный иммуноферментный анализ; ОСМ – обезжиренное сухое молоко; БСА – бычий сывороточный альбумин; SN – отрицательная контрольная сыворотка; SP – положительная контрольная сыворотка; PI – процент ингибиции окрашивания. *По формуле 1.

Note. cELISA – competitive enzyme-linked immunosorbent assay; SN – negative control serum; SP – positive control serum; PI – percent of the staining inhibition. *See equation 1.

Таблица 2. Результаты исследования сывороток крови собак в конкурентном ИФА в 20 повторностях

Table 2. The results of dog blood sera study in a competitive ELISA in 20 replicates

Номер сыворотки Serum number	Концентрация ВНА в FAVN, МЕ/мл VNA concentration in FAVN, IU/ml	Концентрация антител в кИФА Antibody concentration in cELISA		
		Среднее, МЕ/мл Mean, IU/ml	SD, МЕ/мл SD, IU/ml	CV, %
1	0,68	0,64	0,051	7,95
5	0,10	0,08	0,011	13,61
23	0,50	0,52	0,051	9,80
45	12,14	10,72	0,931	8,68
54	4,47	4,82	0,391	8,10

Примечание. ВНА – вируснейтрализующие антитела; кИФА – конкурентный иммуноферментный анализ; FAVN – тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.

Note. VNA – virus neutralizing antibodies; cELISA – competitive enzyme-linked immunosorbent assay; FAVN – fluorescent antibody virus neutralization test; SD – standard deviation; CV – coefficient of variation.

Аналитическая чувствительность конкурентного ИФА

Для определения аналитической чувствительности разработанной тест-системы на основе кИФА исследовали последовательные двукратные разведения сывороток, предварительно протестированные в FAVN. Каждое разведение исследовали в 20 повторностях. Установлено, что концентрации ВНА 0,5 МЕ/мл соответствует PI в кИФА, равный 69,29% (табл. 1). Нижний порог обнаружения ВНА в сыворотке крови для разработанной тест-системы составил менее 0,02 МЕ/мл (рис. 3).

Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность разработанной тест-системы определяли при исследовании гетерологичных сывороток, содержащих антитела к вирусу чумы плотоядных, парвовирусу, коронавирусу, аденовирусу собак I и (или) II серотипа, вирусу парагриппа собак и не содержащих антител к ВБ. Полученные результаты свидетельствуют, что разработанная тест-система является специфичной и не проявляет кросс-реактивности в отношении антител к указанным возбудителям (табл. 3).

Диагностическая специфичность и чувствительность конкурентного ИФА

В отличие от реакции нейтрализации, качество результатов ИФА не зависит от качества исследуемой сыворотки, однако чувствительность и специфичность обусловлены особенностями проведения теста. При исследовании 137 сывороток крови вакцинированных и невакцинированных против бешенства собак специфичность и чувствительность тест-системы на основе кИФА составили 83,1 и 94,9% соответственно (табл. 4). Также отмечена высокая степень корреляции между результатами кИФА и FAVN ($R^2 = 0,968$, $p < 0,001$) (рис. 4).

При проведении ROC-анализа (receiver operating characteristic) AUC (area under curve – площадь под кривой) для кИФА составил 0,961 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,929–0,992), что позволяет считать эту тест-систему пригодной для определения поствакцинального иммунного статуса животного (рис. 5).

Обсуждение

При конструировании тест-систем на основе кИФА в качестве конкурирующего компонента могут быть использованы как моноклональные, так и поликлональные антитела [3]. При создании тест-систем для

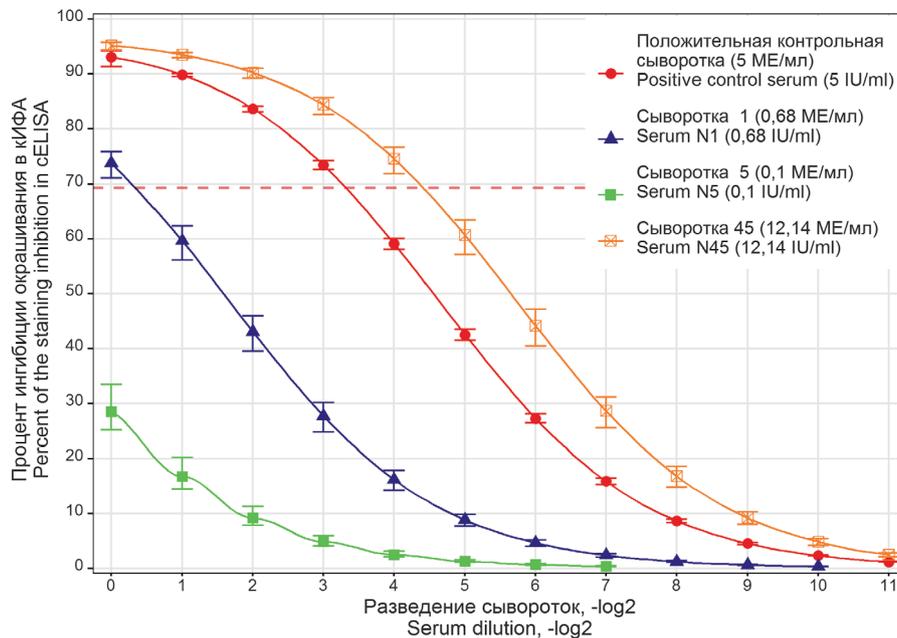


Рис. 3. Определение предела обнаружения антител для конкурентного варианта ИФА. Процент ингибции окрашивания в кИФА приведен с 95% доверительным интервалом. Пунктирной линией обозначен порог процента ингибции окрашивания, соответствующий концентрации вируснейтрализующих антител 0,5 МЕ/мл.

Fig. 3. Determination of the lower limit of an antibody detection for competitive ELISA. The percent of the staining inhibition in cELISA is given with 95% confidence intervals (95% CI). The dotted line indicates the percentage of the staining inhibition threshold corresponding to an antibody concentration of 0.5 IU/ml.

Таблица 3. Результаты исследования сывороток крови собак, не содержащих антитела к вирусу бешенства, в конкурентном ИФА
Table 3. Results of the cELISA testing of dog blood sera that do not contain antibodies to the rabies virus

Сыворотка Serum	Количество образцов Number of samples	Концентрация антирабических антител в кИФА cELISA anti-rabies antibodies concentration	
		≥ 0,5 МЕ/мл ≥ 0.5 IU/ml	< 0,5 МЕ/мл < 0.5 IU/ml
Сыворотка крови собак, вакцинированных препаратом «Вангард Плюс 5 L4 CV» (содержит антитела к CDV, CAV, CCV, CPiV, CPV, L) Blood serum from dogs vaccinated with “Vanguard Plus 5 L4 CV” (contains antibodies to CDV, CAV, CCV, CPiV, CPV, L)	3	0	3
Сыворотка крови собак, вакцинированных препаратом «Вангард 7» или «Эурикан DHPPI + L» (содержит антитела к CDV, CAV, CPiV, CPV, L) Blood serum from dogs vaccinated with “Vanguard 7” or “Eurican DHPPI + L” (contains antibodies to CDV, CAV, CPiV, CPV, L)	14	0	14
Сыворотка крови собак, вакцинированных препаратом «Нобивак DHPPI» (содержит антитела к CDV, CAV, CPiV, CPV) Blood serum from dogs vaccinated with “Nobivak DHPPI” (contains antibodies to CDV, CAV, CPiV, CPV)	9	0	9
Сыворотка крови собак, вакцинированных препаратом «Мультикан-6» (содержит антитела к CDV, CAV, CCV, CPV, L) Blood serum from dogs vaccinated with “Multican-6” (contains antibodies to CDV, CAV, CCV, CPV, L)	17	0	17
Сыворотка «Витакан-С» (содержит антитела к CDV, CPV, CAV) “Vitakan-S” serum (contains antibodies to CDV, CPV, CAV)	10	0	10
Всего Total	53	0	53

Примечание. кИФА – конкурентный иммуноферментный анализ; CAV – аденовирус собак; CCV – коронавирус собак; CDV – вирус чумы плотоядных; CPiV – вирус парагриппа собак; CPV – парвовирус собак; L – лептоспироз.

Note. cELISA – competitive enzyme-linked immunosorbent assay; CAV – Canine adenovirus; CCV – Canine coronavirus; CDV – Canine distemper virus; CPiV – Canine parainfluenza virus; CPV – Canine parvovirus; L – Leptospirosis.

выявления антител к конкретному вирусному белку в качестве антигена используют этот белок, а в качестве конкурирующего компонента – моно- или поликлональные антитела к нему [4, 13–15]. В случае же,

если диагностический набор направлен на определение общего пула антител к вирусу, как это представлено в нашей работе, в качестве антигена используют цельный вирус либо его фрагменты, а в качестве кон-

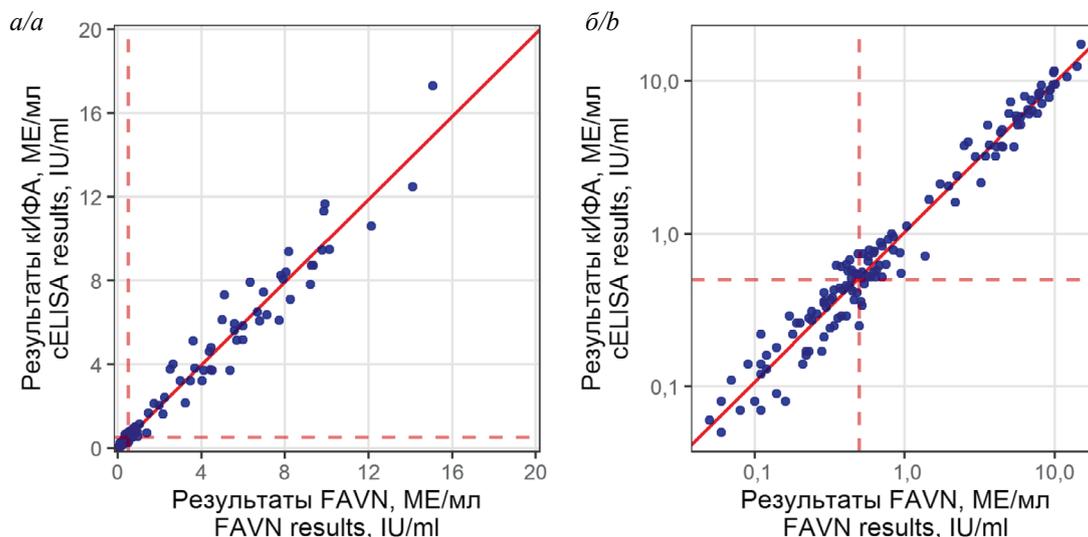


Рис. 4. Корреляция между результатами FAVN и кИФА: *a* – оси X и Y представлены на линейной шкале; *b* – оси X и Y представлены на \log_{10} -шкале. Сплошной обозначена линия регрессии. Пунктирные линии обозначают протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл.
Fig. 4. Correlation between FAVN and cELISA results: *a* – X and Y axes are presented in linear scale; *b* – X and Y axes are presented in \log_{10} scale. The solid line indicates the regression line. Dashed lines represent protective antibody level of 0.5 IU/ml.

Таблица 4. Результаты исследования 137 сывороток крови собак в конкурентном ИФА

Table 4. Results of 137 dog sera testing in a competitive ELISA

Конкурентный ИФА Competitive ELISA	FAVN		Всего Total
	$\geq 0,5$ МЕ/мл $\geq 0,5$ IU/ml	$< 0,5$ МЕ/мл $< 0,5$ IU/ml	
$\geq 0,5$ МЕ/мл $\geq 0,5$ IU/ml	74	10	84
$< 0,5$ МЕ/мл $< 0,5$ IU/ml	4	49	53
Всего Total	78	59	137

Примечание. кИФА – конкурентный иммуноферментный анализ; FAVN – тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами.

Note. cELISA – competitive enzyme-linked immunosorbent assay; FAVN – fluorescent antibody virus neutralization test.

курующего компонента – поликлональные антитела к вирусу [6, 16].

При определении оптимальной методики постановки кИФА возможны модификации с одновременным или последовательным добавлением в лунки исследуемой сыворотки и конкурирующих антител. Вариант кИФА, подразумевающий смешивание конкурирующего компонента с образцом перед добавлением их в лунку [17], не нашёл широкого применения. Ввиду непредсказуемости результата такого взаимодействия компонентов было невозможно определить, насколько активно конкурирующие антитела вытесняют антитела сыворотки из системы и не может ли это привести к искусственному занижению итогового показателя активности исследуемой сыворотки. Поэтому на данный момент большинство тест-систем подразу-

мевают последовательное поэтапное внесение компонентов в лунки планшета [18].

Для выявления образовавшегося комплекса «антиген + антитело» в части тест-систем используют специфические антивидовые антитела, как это зачастую происходит в непрямом варианте ИФА [14, 15], однако такой вариант постановки теста накладывает видовые ограничения на исследуемый материал, а также снижает специфичность и чувствительность тест-системы (например, из-за низкой степени очистки вторичных антител). Со временем антивидовые антитела были заменены на стрептавидин-пероксидазные конъюгаты: высокая аффинность стрептавида к биотинилированным антителам обеспечивает высокую специфичность и чувствительность теста [6–8, 16, 19].

Актуальной задачей на данный момент остаётся разработка новых модификаций ИФА, обладающих большей диагностической специфичностью и чувствительностью. Диагностикумы для определения уровня антител к ВБ на основе нИФА зачастую оказываются недостаточно чувствительны, по сравнению с референс-тестами FAVN и RFFIT [20, 21]. М. Wasniewski с соавт. сообщают, что при 100% специфичности чувствительность тест-системы Platelia TM Rabies II ad usum Veterinarium составляет только 78,2%, при этом лишь 5 из 23 аккредитованных международных лабораторий получили удовлетворительные результаты по показателям специфичности и чувствительности ИФА, по сравнению с FAVN [21]. Примечательно, что, по данным ряда исследований, аналогичный набор для выявления антител к гликопротеину ВБ в образцах сыворотки крови и цереброспинальной жидкости людей обладает высокой специфичностью и чувствительностью по сравнению со стандартными тестами вируснейтрализации [22, 23]. Также вызывает вопросы эф-

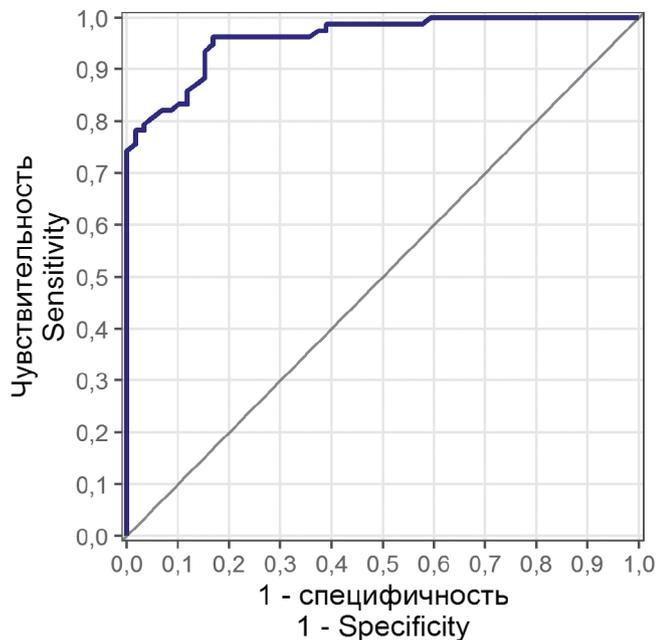


Рис. 5. ROC-кривая для конкурентного варианта ИФА.

Fig. 5. ROC-curve for competitive ELISA.

фективность тест-системы Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect [24]. 8 из 16 лабораторий, протестировавших собственные образцы сывороток крови собак и кошек с помощью тестов FAVN или RFFIT и Serelisa, заявили о неудовлетворительной чувствительности и специфичности Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect (коэффициент соответствия методу вируснейтрализации составил менее 80%), при этом 4 лаборатории получили значительную долю ложноположительных результатов [20]. Коэффициент соответствия теста ИФА референс-методу (RFFIT или FAVN) составил для различных лабораторий от 67,5 до 92,0% [20].

Оптимальным решением на данный момент можно считать варианты кИФА с применением биотинилированных моно- и поликлональных антител. Наиболее специфичной и чувствительной на данный момент является тест-система BioPro ELISA Rabies Ab [6]: при исследовании 107 сывороток крови собак специфичность и чувствительность тест-системы составила 66,7 и 94,4% соответственно. Для разработанной нами тест-системы при исследовании 137 сывороток крови собак эти показатели составили 83,1 и 94,4% соответственно. AUC для BioPro ELISA Rabies Ab при исследовании 560 сывороток крови лисиц (в качестве референс-метода выступала тест-система на основе нИФА Platelia Rabies II Kit ad usum veterinarium, Bio-Rad) составил 0,977 (95% ДИ 0,961–0,988), а для нашей тест-системы при исследовании 137 сывороток крови собак (референс-метод – модификация FAVN) – 0,961 (95% ДИ 0,929–0,992).

Заключение

Таким образом, по приведенным выше параметрам разработанная нами тест-система не уступает совре-

менным коммерческим тест-системам для выявления антител к ВБ, а также превосходит по своей специфичности и чувствительности диагностикумы на основе нИФА. Полученные результаты позволяют рекомендовать разработанную тест-систему на основе кИФА для рутинных исследований по определению уровня антирабических антител в сыворотке крови собак при оценке эффективности программ массовой вакцинации.

ЛИТЕРАТУРА

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals – 2018. Chapter 3.1.17. Rabies (infection with Rabies virus and other Lyssaviruses). Available at: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf
- Караулов А.К., Варкентин А.В., Петрова О.Н., Таценко Е.Е., Семёнова Н.А., Щербин С.В. и др. Отчет по эпизоотической ситуации в РФ за 2021 г. Available at: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/iac/2022/2021_31_12_godovoy_otchet.pdf
- Лобанова В.А., Клюкина В.И. Биотехнологические аспекты совершенствования методов выявления антител к вирусу бешенства животных. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова*. 2021; 17(1): 62–75.
- Sugiyama M., Yoshiki R., Tatsuno Y., Hiraga S., Itoh O., Gamoh K., et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(6): 727–30. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.6.727-730.1997>
- Bedeković T., Šimić I., Krešić N., Lojkić I., Mihaljević Ž., Sućec I., et al. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 76. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0701-0>
- Mojžiš M., Korytár P., Jerg S. Development and validation of ELISA test for detection of rabies anti-glycoprotein antibodies. In: *Proceedings of the International Conference on Rabies in the Americas (RITA XIX)*. Atlanta; 2008: 48–9.
- Wasniewski M., Cliquet F. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *J. Virol. Methods.* 2012; 179(1): 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.019>
- Wasniewski M., Almeida I., Baur A., Bedekovic T., Boncea D., Chaves L.B., et al. First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe. *J. Virol. Methods.* 2016; 238: 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.006>
- Лобанова В.А., Клюкина В.И. Получение компонентов тест-системы на основе конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу бешенства. *Ветеринарный врач*. 2022; (2): 29–39. https://doi.org/10.33632/1998-698X.2022_29_39
- Burns R., ed. *Immunochemical Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005.
- Gibbs J., Vessels M., Rothenberg M. Effective blocking procedures in ELISA assays. Application note. Available at: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-456.pdf>
- Новиков Д.А., Новочадов В.В. *Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи)*. Волгоград; 2005.
- Esterhuysen J.J., Prehaud C., Thomson G.R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J. Virol. Methods.* 1995; 51(1): 31–42. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00098-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00098-2)
- Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Сабирова В.В., Гафарова А.З., Елаков А.Л. Разработка и применение блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства. *Ветеринарная медицина*. 2012; (96): 64–6.
- Aronthippaitoon Y., Samer W., Atuntee T., Thananchai H., Thongkorn K., Pongsopawijit P., et al. A cost effective easy competitive enzyme-linked immunosorbent assay suitable for monitoring protective immunity against the rabies virus in the serum of humans and dogs. *Jpn J. Infect. Dis.* 2019; 72(2): 99–105. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.248>
- Fontana D., Rodriguez M.C., Garay E., Russo S., Prieto C. Optimization and validation of a blocking ELISA for quantitation of

- anti-rabies immunoglobulins in multispecies sera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104(9): 4127–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10490-6>
17. Zhang S., Liu Y., Zhang F., Hu R. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs. *Vaccine.* 2009; 27(15): 2108–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.126>
 18. Korimbocus J., Dehay N., Tordo N., Cano F., Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine.* 2016; 34(28): 3310–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
 19. Muhamuda K., Madhusudana S.N., Ravi V. Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post-exposure rabies vaccination in humans. *Int. J. Infect. Dis.* 2007; 11(5): 441–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.09.013>
 20. Servat A., Cliquet F. OIE Reference Laboratory for Rabies; WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus. Res.* 2006; 120(1-2): 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.011>
 21. Wasniewski M., Labbe A., Tribout L., Rieder J., Labadie A., Schreffer J.L., et al. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. *J. Virol. Methods.* 2014; 195: 211–20. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.021>
 22. Feyssaguet M., Dacheux L., Audry L., Compoin A., Morize J.L., Blanchard I., et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine.* 2007; 25(12): 2244–51. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.012>
 23. Welch R.J., Anderson B.L., Litwin C.M. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 6): 806–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.006064-0>
 24. Cliquet F., McElhinney L.M., Servat A., Boucher J.M., Lowings J.P., Goddard T., et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J. Virol. Methods.* 2004; 117(1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.12.001>
 8. Wasniewski M., Almeida I., Baur A., Bedekovic T., Boncea D., Chaves L.B., et al. First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe. *J. Virol. Methods.* 2016; 238: 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.006>
 9. Lobanova V.A., Klyukina V.I. Obtaining components of a test system based on a competitive ELISA for the detection of antibodies to the rabies virus. *Veterinarnyy vrach.* 2022; (2): 29–39. https://doi.org/10.33632/1998-698X.2022_29_39 (in Russian)
 10. Burns R., ed. *Immunochemical Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005.
 11. Gibbs J., Vessels M., Rothenberg M. Effective blocking procedures in ELISA assays. Application note. Available at: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-456.pdf>
 12. Novikov D.A., Novochadov V.V. *Statistical Methods in Biomedical Experiment (Typical Cases) [Statisticheskie metody v mediko-biologicheskoy eksperimente (tipovyye sluchai)]*. Volgograd; 2005. (in Russian)
 13. Esterhuysen J.J., Prehaud C., Thomson G.R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J. Virol. Methods.* 1995; 51(1): 31–42. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00098-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00098-2)
 14. Hismatullina N.A., Guljukin A.M., Sabirova V.V., Gafarova A.Z., Elakov A.L. Development and application of a novel ELISA-block test-system to improve rabies vaccine prevention. *Veterinarnaya meditsina.* 2012; (96): 64–6. (in Russian)
 15. Aronthippaitoon Y., Samer W., Atuntee T., Thananchai H., Thongkorn K., Pongsopawijit P., et al. A cost effective easy competitive enzyme-linked immunosorbent assay suitable for monitoring protective immunity against the rabies virus in the serum of humans and dogs. *Jpn J. Infect. Dis.* 2019; 72(2): 99–105. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.248>
 16. Fontana D., Rodriguez M.C., Garay E., Russo S., Prieto C. Optimization and validation of a blocking ELISA for quantitation of anti-rabies immunoglobulins in multispecies sera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104(9): 4127–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10490-6>
 17. Zhang S., Liu Y., Zhang F., Hu R. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs. *Vaccine.* 2009; 27(15): 2108–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.126>
 18. Korimbocus J., Dehay N., Tordo N., Cano F., Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine.* 2016; 34(28): 3310–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
 19. Muhamuda K., Madhusudana S.N., Ravi V. Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post-exposure rabies vaccination in humans. *Int. J. Infect. Dis.* 2007; 11(5): 441–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.09.013>
 20. Servat A., Cliquet F. OIE Reference Laboratory for Rabies; WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus. Res.* 2006; 120(1-2): 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.011>
 21. Wasniewski M., Labbe A., Tribout L., Rieder J., Labadie A., Schreffer J.L., et al. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. *J. Virol. Methods.* 2014; 195: 211–20. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.021>
 22. Feyssaguet M., Dacheux L., Audry L., Compoin A., Morize J.L., Blanchard I., et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine.* 2007; 25(12): 2244–51. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.012>
 23. Welch R.J., Anderson B.L., Litwin C.M. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 6): 806–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.006064-0>
 24. Cliquet F., McElhinney L.M., Servat A., Boucher J.M., Lowings J.P., Goddard T., et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J. Virol. Methods.* 2004; 117(1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.12.001>

REFERENCES

1. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals – 2018. Chapter 3.1.17. Rabies (infection with Rabies virus and other Lyssaviruses). Available at: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf
2. Karaulov A.K., Varkentin A.V., Petrova O.N., Tatsenko E.E., Semenova N.A., Shcherbin S.V., et al. Report of the information and analytical center of the Veterinary Supervision Department of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor) (FSBI «Federal Centre for Animal Health» (FGBI «ARRIAH») on the epizootic situation in the Russian Federation for 2020. Available at: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/2022/2021_31_12_godovoy_otchet.pdf (in Russian)
3. Lobanova V.A., Klyukina V.I. Biotechnological aspects of improving detection methods antibodies to animal rabies virus. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu. A. Ovchinnikova.* 2021; 17(1): 62–75. (in Russian)
4. Sugiyama M., Yoshiki R., Tatsuno Y., Hiraga S., Itoh O., Gamoh K., et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(6): 727–30. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.6.727-730.1997>
5. Bedeković T., Šimić I., Krešić N., Lojkić I., Mihaljević Ž., Sućec I., et al. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 76. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0701-0>
6. Mojžiš M., Korytár P., Jerg S. Development and validation of ELISA test for detection of rabies anti-glycoprotein antibodies. In: *Proceedings of the International Conference on Rabies in the Americas (RITA XIX)*. Atlanta; 2008: 48–9.
7. Wasniewski M., Cliquet F. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *J. Virol. Methods.* 2012; 179(1): 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.019>

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Разработка способа выявления специфических антител к белку Е вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа

Кривошеина Е.И.¹, Карташов М.Ю.^{1,2}, Найденова Е.В.³, Ушкаленко Н.Д.¹, Пьянков С.А.¹, Терновой В.А.¹, Локтев В.Б.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, г. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Минобрнауки России, 630090, г. Новосибирск, Россия;

³ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов, Россия

Введение. Жёлтая лихорадка (ЖЛ) остаётся одной из самых распространённых природно-очаговых инфекционных болезней в мире. В связи с возрастающим туристическим потоком в страны, эндемичные по ЖЛ, обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus*, являющихся основными переносчиками вируса ЖЛ (ВЖЛ), и тем фактом, что в медицинских учреждениях нашей страны можно получить живую аттенуированную вакцину против ЖЛ, но нет возможности оценки эффективности вакцинации, возникает вопрос о разработке и внедрении в практику диагностических наборов для выявления антител к возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель работы – разработка способа выявления специфических антител класса IgG к белку Е ВЖЛ методом ИФА и оценка его диагностических характеристик.

Материалы и методы. Методом обратной транскрипции на матрице РНК ВЖЛ, выделенного на клеточной культуре *Aedes albopictus* clone C6/36, синтезирована специфичная кДНК и амплифицирован участок генома белка Е ВЖЛ, который был клонирован в плазмиду рЕТ160 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный фрагмент гена использовали в качестве ДНК-матрицы для создания рекомбинантного аналога третьего домена белка Е ВЖЛ в клетках *Escherichia coli* (BL-21(DE3)). Далее произведена оценка иммуногенности полученного антигена и оптимизация условий анализа.

Результаты. Определены оптимальные условия наработки полученного рекомбинантного белка Е ВЖЛ, подтверждена его специфичность иммунологическими методами (вестерн-блоттинг и ИФА), подобраны сорбционные буферы и блокирующие растворы, проведён анализ чувствительности и специфичности рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ.

Заключение. Был разработан способ выявления специфических антител класса IgG к белку Е ВЖЛ методом ИФА. Данный диагностический набор может использоваться как для изучения протективных свойств вакцины против ЖЛ, так и для выявления завозных случаев инфекции на неэндемичных территориях.

Ключевые слова: вирус жёлтой лихорадки; специфические антитела; диагностика жёлтой лихорадки; белок Е флавивирусов; рекомбинантные белки; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А., Терновой В.А., Локтев В.Б. Разработка способа выявления специфических антител к белку Е вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 341-350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора, 630559, г. Кольцово, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Участие авторов: Кривошеина Е.И. – планирование, организация и проведение исследований, анализ литературных данных, оформление результатов, написание статьи; Карташов М.Ю. – организация и планирование исследований, оформление результатов и иллюстраций, статистическая обработка данных, написание статьи; Найденова Е.В. – организация и проведение исследований, написание статьи; Ушкаленко Н.Д. – проведение исследований; Пьянков С.А. – проведение исследований; Терновой В.А. – руководство исследованиями; Локтев В.Б. – общее руководство работой.

Финансирование: Исследования проводились в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации № 2985-р от 14 ноября 2020 г. о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Благодарность: Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе образцов биологического материала руководству и сотрудникам лаборатории вирусных геморрагических лихорадок г. Конакри (Гвинейская Республика).

Конфликт интересов: Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Этическое утверждение: Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования сывороток крови жителей Гвинейской Республики одобрен Этическим комитетом Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

Поступила 10.06.2022

Принята в печать 11.08.2022

Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immunoassay

Ekaterina I. Krivosheina¹, Mikhail Yu. Kartashov^{1,2}, Ekaterina V. Naidenova³,
Nikita D. Ushkalenko¹, Stepan A. Pyankov¹, Vladimir A. Ternovoi¹, Valery B. Loktev¹

¹FSSI State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³FSSI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Saratov, Russia

Introduction. Yellow fever (YF) remains one of the most common natural focal infectious diseases in the world. In connection with the increasing tourist flow to countries endemic for YF, the discovery of stable populations of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* which are the main vectors of the yellow fever virus (YFV), in the southern regions of Russia, and the fact that in medical institutions in our country it is possible to obtain a live attenuated vaccine against YF, but there is no way to evaluate the effectiveness of vaccination, the question arises of the development and implementation of diagnostic kits for detecting antibodies (AB) to the pathogen by enzyme immunoassay (ELISA).

The aim of this study was to develop a method for detecting specific IgG antibodies to the E protein of YFV by ELISA and assessing its diagnostic characteristics.

Materials and methods. A specific cDNA was synthesized by reverse transcription on an RNA template of YFV isolated on a cell culture of *Aedes albopictus* clone C6/36, and a fragment of the genome coding the YFV E protein was amplified and subsequently cloned into the plasmid pET160 (Thermo Fisher Scientific, USA). The resulting gene fragment was used as a DNA template to obtain a recombinant analog of the third domain of the YFV E protein in *Escherichia coli* cells (BL-21(DE3)). Next, the immunogenicity of the obtained antigen was evaluated and the analysis conditions were optimized.

Results. The optimal conditions for the production of the obtained recombinant E protein of YFV were determined, its specificity was confirmed by immunological methods (Western blot and ELISA), sorption buffers and blocking solutions were selected, and sensitivity and specificity of detection of antibodies to YFV using the recombinant antigen were assessed.

Conclusion. A method for the detection of specific IgG antibodies to the YFV E protein by ELISA was developed. This diagnostic kit can be used both to study the protective properties of the YF vaccine and to detect imported cases of infection in non-endemic areas.

Keywords: yellow fever virus; specific antibodies; yellow fever diagnostics; flavivirus E protein; recombinant proteins; enzyme immunoassay

For citation: Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immunoassay. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 341-350 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-123>

For correspondence: Mikhail Yu. Kartashov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Contribution: Krivosheina E.I. – planning, organization and conduct of research, analysis of literature data, presentation of results, writing an article; Kartashov M.Yu. – organization and planning of research, presentation of results and illustrations, statistical processing of data, writing an article.

Naidenova E.V. – organizing and conducting research, writing an article; Ushkalenko N.D. – conducting research; Pyankov S.A. – conducting research; Ternovoi V.A. – research management; Loktev V.B. – general guidance.

Information about the authors:

Krivosheina E.I., <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Ushkalenko N.D., <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

Pyankov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>

Ternovoi V.A., <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Funding. The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation No. 2985-r of November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Republic of Guinea (protocol No. 129/CNERS/16 of August 31, 2015).

Received 10 June 2022
Accepted 11 August 2022
Published 31 August 2022

Введение

Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – острая природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [1–4], которым является одноименный вирус, относящийся к семейству *Flaviviridae*. Территориями, где выявлена циркуляция вируса ЖЛ (ВЖЛ), являются регионы Африки, расположенные к югу от Сахары, а также Центральной и Южной Америки. Основные переносчики возбудителя – комары рода *Aedes*, в основном *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, обитают как на эндемичных территориях (Африка и Южная Америка), так и в регионах Европы с тёплым климатом [5].

Специалистами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) разработана стратегия по ликвидации эпидемий ЖЛ (The Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE)), которая применяется и поддерживается в 40 странах Африки, Южной и Северной Америки. Целью создания такой программы являются эпидемиологический контроль за данной инфекцией и массовая вакцинация населения, проживающего в поражённых районах, в которой, по прогнозам, к 2026 г. примут участие более 1 млрд человек. Ежегодно ВОЗ публикует перечень стран, где существует риск возникновения вспышек ЖЛ, а также список государств, при въезде в которые требуется наличие международного свидетельства о вакцинации против ЖЛ для путешественников.

В настоящее время проблема распространения ВЖЛ является актуальной и для Российской Федерации. Так, в районе г. Сочи (Краснодарский край) были обнаружены местные популяции комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* [6, 7]. После долгого отсутствия комары *Ae. aegypti* вновь зарегистрированы на территории Черноморского побережья Кавказа и в Крыму. В случае заноса возбудителя не исключена возможность возникновения вспышки ЖЛ и на этих территориях [8, 9]. Также всё большую популярность среди населения приобретают туристические направления в экзотические страны и регионы, где при въезде необхо-

дим международный сертификат о вакцинации против ЖЛ. По данным Роспотребнадзора Российской Федерации, в 2021 г. живой аттенуированной вакцины против ЖЛ производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова (Москва) было вакцинировано более 11 тыс. россиян [10]. Но в то же время наборы реагентов для выявления специфических антител (IgM и IgG) к ВЖЛ и оценки эффективности иммунизации ни одной отечественной компанией не производятся.

По данным литературы, в настоящее время в мире зарегистрировано не более 10 диагностических препаратов, позволяющих выявлять специфические антитела классов IgM или IgG к ВЖЛ, но все они рекомендованы исключительно для научных исследований. Также есть ограничения по использованию данных тестов для выявления антител у вакцинированных людей [11]. На территории Российской Федерации разрешены к применению 6 коммерческих наборов для выявления антител IgM/IgG к возбудителю ЖЛ производства компании Euroimmun (Германия), которые основаны на использовании метода непрямой иммунофлуоресценции специфических антител. Ограничениями для широкого использования этих тестов являются сложность интерпретации результатов, небольшое количество одновременно анализируемых проб (до 10) и высокая стоимость, по сравнению с другими препаратами для диагностики ВЖЛ.

Одним из широко используемых методов для выявления как вирусных антигенов, так и специфических антител к возбудителю, является иммуноферментный анализ (ИФА), который обладает рядом преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями:

- высокая чувствительность;
- специфичность и воспроизводимость результатов;
- возможность получения количественных данных;
- автоматизация всех этапов постановки.

В связи с этим вопрос разработки и внедрения в практику препаратов для оценки качества иммунизации и диагностики ЖЛ, основанных на исполь-

зовании метода ИФА, является очень актуальным. Для создания таких диагностических наборов необходимо использовать антигенные белки, способные высокоспецифично связываться с иммуноглобулинами классов IgM и IgG в организме инфицированного, переболевшего или вакцинированного человека. В составе вирусного генома ВЖЛ имеются 3 гена, кодирующие белки E, NS1 и NS3, которые способны индуцировать иммунный ответ в организме (рис. 1). Белок E отвечает за начальные фазы инфицирования клеток-хозяев, а также является основной мишенью для иммунного ответа хозяина. Белки NS1 и NS3 связаны с инфицированной клеткой и также являются мишенями для иммунной элиминации. Антитела к белку NS1 связывают компоненты системы комплемента и способствуют формированию защитного иммунитета, лизируя инфицированные клетки [5].

Белок E флавивирусов состоит из трёх отдельных доменов, которые соединены короткими гибкими шарнирными областями. Первый является центральным и соединяет два других; второй представляет собой удлинённую структуру, которая обеспечивает димеризацию белков E в зрелом вирионе [12]; а третий принимает иммуноглобулин-подобную складку на С-конце и также представляет собой ту часть белка E, которая выступает дальше всего от поверхности зрелого вириона и, предположительно, содержит сайты связывания для клеточных факторов, участвующих в прикреплении и проникновении вируса в клетку [13].

Согласно литературным данным, все три домена белка E распознаются нейтрализующими антителами, хотя и с сильно варьирующей активностью [1]. Показано, что третий домен белка E ВЖЛ имеет особенно-

сти аминокислотного состава, которые отличают его от аналогичных белковых структур других флавивирусов [14]. Эти различия являются уникальными для ВЖЛ и представляют собой типоспецифичные эпитопы нейтрализации для отдельных флавивирусов, и поэтому данный участок белка можно использовать для специфической серодиагностики ВЖЛ.

Целью нашего исследования была разработка способа выявления специфических антител класса IgG к белку E ВЖЛ методом ИФА. В работе описаны этапы получения и очистки рекомбинантного аналога третьего домена белка E ВЖЛ, оптимизации его сорбирования на полистироловых планшетах и тестирование полученного набора реагентов.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали вакцинный штамм 17D ВЖЛ, который нарабатывали на клеточной культуре *Aedes albopictus* C6/36, полученной из коллекции культур клеток ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора [15].

Получение кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота) ВЖЛ. Выделение суммарных нуклеиновых кислот и постановка реакции обратной транскрипции производились с использованием коммерческих наборов «РИБО-преп» и «Реверта-100-L» (ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора), согласно инструкциям производителя.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенирование. Дизайн олигонуклеотидных праймеров осуществляли при помощи программы PerlPrimer v. 1.1.21 [16], используя известные нуклеотидные

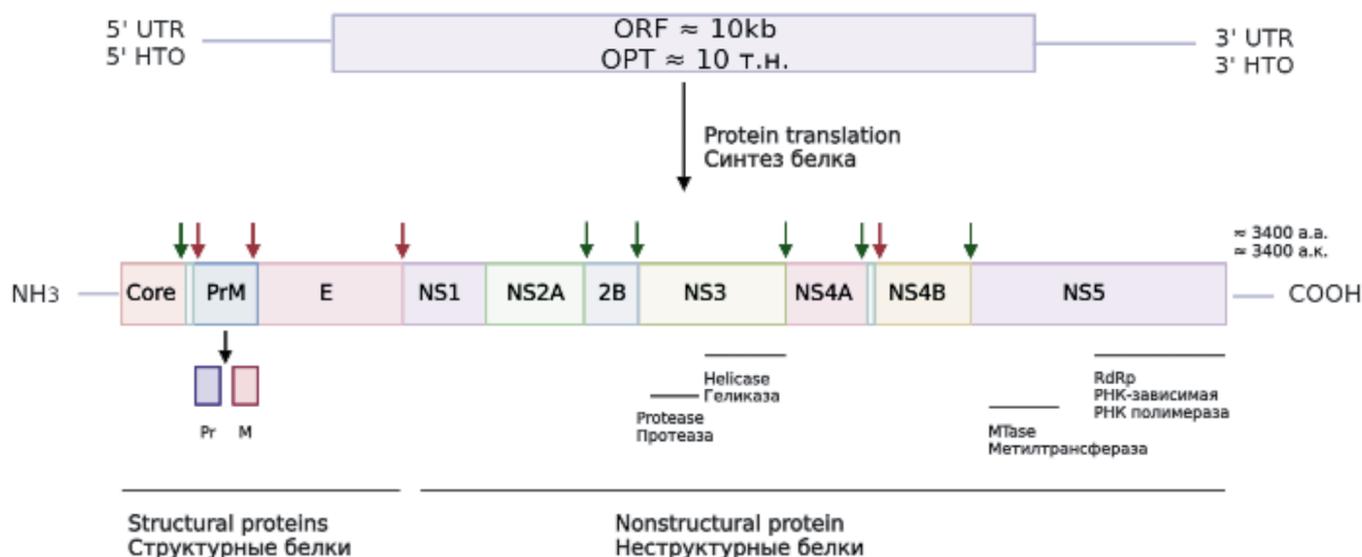


Рис. 1. Схематичное изображение вирусной РНК и полипротеинов вируса жёлтой лихорадки. Стрелки указывают сайты расщепления в полипротеине, которые процессируются протеазами клеточного (красные стрелки) или вирусного происхождения (зелёные стрелки).

Fig. 1. Schematic representation of YFV viral RNA and polyprotein. Arrows indicate cleavage sites in the polyprotein that are processed by cellular (red arrows) or viral (green arrows) proteases.

последовательности геномов ВЖЛ, доступные в базе данных GenBank [17]. Анализ вставок проводили с праймерами, комплементарными плазмидной ДНК с обоих концов от вставки (табл. 1). Продукты амплификации секвенировали по обеим цепям модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза на автоматическом секвенаторе 3130xl GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием пакета программ UniproUGENE v.1.30 [18] и MEGA7 [19].

Получение гибридной плазмиды и клонов-продуцентов. Для клонирования использовали 2 мкл свеженаработанного ампликона и 0,5 мкл вектора pET160-TOPO по инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Выделение плазмидной ДНК осуществляли, используя «Набор diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий» («ДИАЭМ», Россия). Гибридной плазмидой трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, США) и засеивали на чашки Петри с агаризованной средой LB (AppliChem, Германия) с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл в качестве селективного маркера. Полученные клоны-продуценты анализировали по уровню экспрессии после индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) с SDS по Лэммли [20].

Выделение рекомбинантного белка. Очистку белка осуществляли из клеточного осадка, полученного из 500 мл бактериальной культуры, индуцированной

ной ИПТГ, коммерческим набором His-Spin Protein Miniprep (Zymo Research, США).

Подбор оптимальных условий сорбирования антигена. Полученный очищенный рекомбинантный белок сорбировали на полистироловых планшетах для ИФА (Thermo Fisher Scientific, США) в трёх сорбционных растворах: ацетатном (pH 4,5), карбонатном (pH 11,5) и карбонатно-бикарбонатном (pH 9,6). Блокировку осуществляли двумя разными растворами: сахарозой или пептоном с казеином. Подробный состав буферов представлен в табл. 2.

Обработка схемы ИФА. Твердофазный ИФА проводили в два этапа. Исследуемые образцы инкубировали с антигеном, сорбированным на полистироловые планшеты (в разведении 1 : 500) и после пятикратной отмывки от несвязавшегося с антигеном материала инкубировали с конъюгатом против IgG человека. Затем после второй пятикратной отмывки от образовавшихся иммунных комплексов производили визуализацию результатов ИФА путём добавления раствора хромогена. После внесения стоп-реагента учитывали результаты реакции на планшетном ридере MultiscanGO (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм с референс-волной при 630 нм.

Постановка вестерн-блоттинга. Предварительно выполняли электрофоретическое разделение белка в денатурирующих условиях в 12% ПААГ. Далее переносили белки из геля на нитроцеллюлозную мембрану с использованием спиртового Tris-HCl-буфера (pH 8,0) и камеру для полусухого переноса. Результат детектировали окраской мембраны пунцовым S. Блоттинг осуществляли в вакуум-системе

Таблица 1. Перечень олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Table 1. List of oligonucleotide primers used in the study

Праймер Primer	Структура Structure	Длина фрагмента (bp) Fragment length(bp)	Температура отжига (°C) Annealing temperature (°C)
E3F	5'CACCGCCGCCACTATCAGAGTACTGG 3'	480	57
E3R	5'CTTTCCTATTGARCTTCCCTCTTTGTGC 3'		
pET-F	5'GACTCACTATAGGGGAATTGTGAGC 3'	338	54
pET-R	5'STAGTTATTGCTCAGCGGTGGC 3'		

Таблица 2. Сорбционные и блокирующие растворы

Table 2. Sorption and blocking solutions

Наименование буфера Buffer name	Состав Composition	pH
Ацетатный Acetate	1M CH ₃ COOH	4,5
Карбонатный Carbonate	Na ₂ CO ₃ , NaN ₃	11,5
Карбонатно-бикарбонатный Carbonate-bicarbonate	Na ₂ CO ₃ , Na ₂ HCO ₃	9,6
Раствор для блокировки 1 Blocking solution 1	0,1% казеин (casein), 1% сахароза (sucrose)	–
Раствор для блокировки 2 Blocking solution 2	0,1% казеин (casein), 1% пептон (peptone)	–

SNAPID (Millipore, США). Блокировку мембраны проводили 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,1% твина 20 (ФСБ-Т). После выполняли последовательные инкубации с сыворотками и конъюгатом антител против иммуноглобулинов человека с щелочной фосфатазой (Sigma, США), затем мембрану отмывали раствором ФСБ-Т. Хромогенную реакцию выполняли готовым субстратом BCIP/NBT (Sigma, США). Реакцию останавливали отмывкой дистиллированной водой. Полученные после анализа мембраны высушивали и учитывали результаты блота в гель-документирующей системе iBright CL750 (Thermo Fisher Scientific, США). Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения Invitrogeni Bright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, США).

Используемые сыворотки. Перечень сывороток крови людей, используемых в настоящем исследовании, указан в **табл. 3**. Присутствие или отсутствие антител в сыворотках было подтверждено следующими коммерческими диагностическими препаратами: набор реагентов для выявления антител класса IgG к ВЖЛ методом ИФА Human Yellow Fever Virus IgG (YFV-IgG) (Abbexa, Великобритания); набор реагентов для выявления антигена NS1 вирусов денге и специфических антител IgM/IgG методом иммунохроматографического анализа (ИХА) Dengue fever rapid diagnostic test (Dengue Duo) (SD BIOLINE, Южная Корея); набор реагентов для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита «ВектоВКЭ-IgG» (№ РЗН 2017/5605) и набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуногло-

булинов классов G и M к вирусу гепатита С «Бест анти-ВГС» (№ РЗН 2015/2352) («ВекторБЕСТ», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования сывороток крови жителей Гвинейской Республики одобрен решением Этического комитета Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

Результаты и обсуждение

В результате генно-инженерных манипуляций была получена гибридная плазмида pET160-E3, содержащая открытую рамку считывания, кодирующую фрагмент гена белка E длиной 221 а.о. с шестью остатками гистидина, что обеспечивает последующее выделение белка на Ni-хелатном носителе и остатками полилинкера векторной плазмиды pET160 под контролем промотора фага T7.

Клонированный фрагмент гена белка E ВЖЛ использовали в качестве ДНК-матрицы для получения рекомбинантного аналога третьего домена в клетках *E. coli* (штамм BL-21 (DE3)). Штамм, трансформированный плазмидной ДНК pET160-E3, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл), после чего добавляли индуктор Lac-оперона ИПТГ в различных концентрациях (0,1, 1 и 10 мМ) и культивировали при разных температурах (25, 30 и 37°C при покачивании на 180 об/мин) с отбором проб в трёх временных точках: до индукции, через 5 и 18 ч после добавления ИПТГ. Выбор клонов-продуцентов про-

Таблица 3. Образцы использованных в исследовании сывороток крови людей

Table 3. Human serum samples used in the study

Исследуемый материал Tested samples	Количество образцов Number of samples
Сыворотки крови людей, вакцинированных против ВЖЛ (Российская Федерация) Sera of people vaccinated against YFV (Russian Federation)	30
Сыворотки крови больных и переболевших ЛД (Российская Федерация) Sera of patients and recovered from DENV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови людей, вакцинированных против ВКЭ (Российская Федерация) Sera of people vaccinated against TBEV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови больных ВГС (Российская Федерация) Sera of patients with HCV (Russian Federation)	10
Сыворотки крови людей, у которых отсутствуют антитела к ВЖЛ, ЛД, ВКЭ и ВГС (Российская Федерация) Sera of people who do not have antibodies to YFV, DENV, TBEV and HCV (Russian Federation)	30
Сыворотки крови людей с неизвестным иммунным статусом по ВЖЛ (Гвинейская Республика) Sera of people with unknown immune status for YFV (Republic of Guinea)	250

Примечание. ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки; ЛД – лихорадка денге; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВГС – вирус гепатита С.

Note. YFV – yellow fever virus; DENV – dengue virus; TBEV – tick-borne encephalitis virus, HCV – hepatitis C virus.

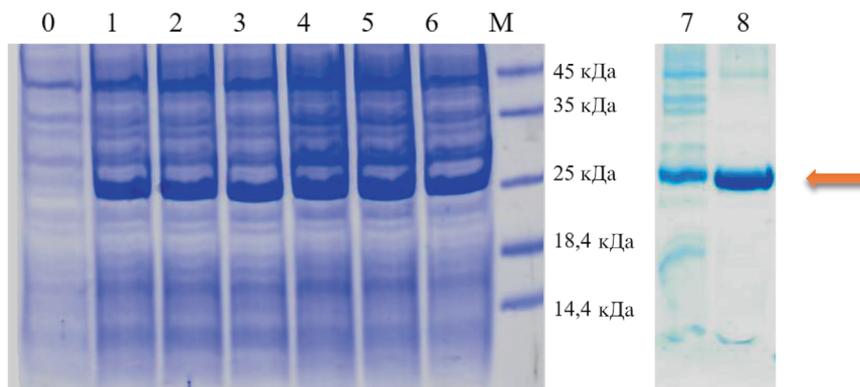


Рис. 2. Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* BL-21 (DE3) и очищенного рекомбинантного белка в 15% ПААГ-электрофорезе с SDS: 0 – до индукции ИПТГ; 1–7 – инкубация при 25°C при различных условиях: 1–3 инкубация в течение 5 ч после добавления ИПТГ в концентрациях 0,1, 1 и 10 мМ соответственно; 4–6 – инкубация в течение 18 ч после добавления ИПТГ в концентрациях 0,1, 1 и 10 мМ соответственно; 7 – спустя 18 ч после добавления ИПТГ 1 мМ/мл; 8 – очищенный рекомбинантный белок. Стрелкой обозначено положение рекомбинантного белка Е ВЖЛ. М – маркер; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки.

Fig. 2. Electrophoregram of *E. coli* BL-21 (DE3) cell lysates and purified recombinant protein in 15% PAGE-electrophoresis with SDS: 0 – before IPTG induction; 1–7 – incubation at 25°C under various conditions: 1–3 incubation for 5 hours after adding IPTG at concentrations of 0.1, 1 and 10 mM, respectively; 4–6 – incubation for 18 hours after adding IPTG at concentrations of 0.1, 1 and 10 mM, respectively; 7 – 18 hours after adding IPTG at concentration 1 mM/ml; 8 – purified recombinant protein. The arrow indicates the position of the recombinant YFV E protein. M – marker. (IPTG – isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; YFV – yellow fever virus).

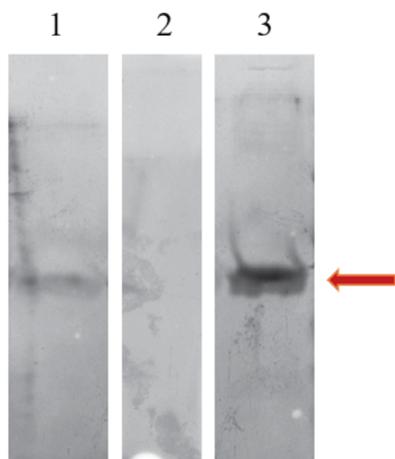


Рис. 3. Результаты выявления очищенного антигена методом вестерн-блоттинга: дорожка 1 – обработанная сывороткой, содержащей антитела к вирусу денге; дорожка 2 – обработанная сывороткой, не содержащей антитела к ВЖЛ, ВКЭ, ВГС, вирусу денге; дорожка 3 – обработанная сывороткой крови с антителами к ВЖЛ. Стрелкой обозначено положение рекомбинантного белка Е ВЖЛ. ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВГС – вирус гепатита С.

Fig. 3. The results of the detection of the purified antigen by Western blotting: lane 1 – treated with serum containing antibodies to the dengue virus; lane 2 – serum that does not contain antibodies to YFV, TBEV, HCV, dengue virus; lane 3 – blood serum with antibodies to YFV. The arrow indicates the position of the recombinant YFV E protein. YFV – yellow fever virus; TBEV – tick-borne encephalitis virus; HCV – hepatitis C virus.

водили по наличию экспрессируемого белка методом электрофореза в 15% ПААГ (рис. 2) с SDS. В серии экспериментов показано, что максимальная продукция рекомбинантного белка происходит на 18-й час

инкубации при температуре 25°C после добавления индуктора в конечной концентрации 1 мМ/мл.

После подбора оптимальных условий получения рекомбинантного белка Е ВЖЛ в составе лизатов клеток *E. coli* была произведена его наработка в 500 мл культуральной среды LB (при температуре 25°C 180 об/мин в течение 18 ч после добавления ИПТГ (в конечной концентрации 1 мМ/мл)) и дальнейшая очистка на Ni-хелатном носителе. Гомогенность и степень очистки белка определяли также с помощью электрофореза в 15% ПААГ с SDS. Полученный рекомбинантный белок представлен единичной полосой с молекулярной массой ≈23,5 кДа (рис. 2).

Для определения специфичности взаимодействия полученного рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ, а также её отсутствия к антителам других флавивирусов нами был проведён ряд экспериментов с использованием вестерн-блот-анализа и ИФА.

Исследование в вестерн-блот-анализе показало специфичное взаимодействие образца сыворотки крови, содержащей антитела к ВЖЛ, с иммобилизованным на нитроцеллюлозной мембране рекомбинантным вирусным антигеном. Окрашивание происходило в зоне соответствия молекулярной массы и не наблюдалось в двух контрольных полосках на нитроцеллюлозных мембранах, обработанных сыворотками крови, в которых отсутствовали антитела к ВЖЛ (рис. 3).

Следующим этапом работы были подбор оптимальных условий для сорбции очищенного рекомбинантного белка Е ВЖЛ на полистироловых планшетах и выбор подходящего блокирующего буфера. Для сорбирования полученный препарат разводили 1 : 500 в трёх сорбционных растворах – ацетатном, карбонатном и карбонатно-бикарбонатном. В каче-

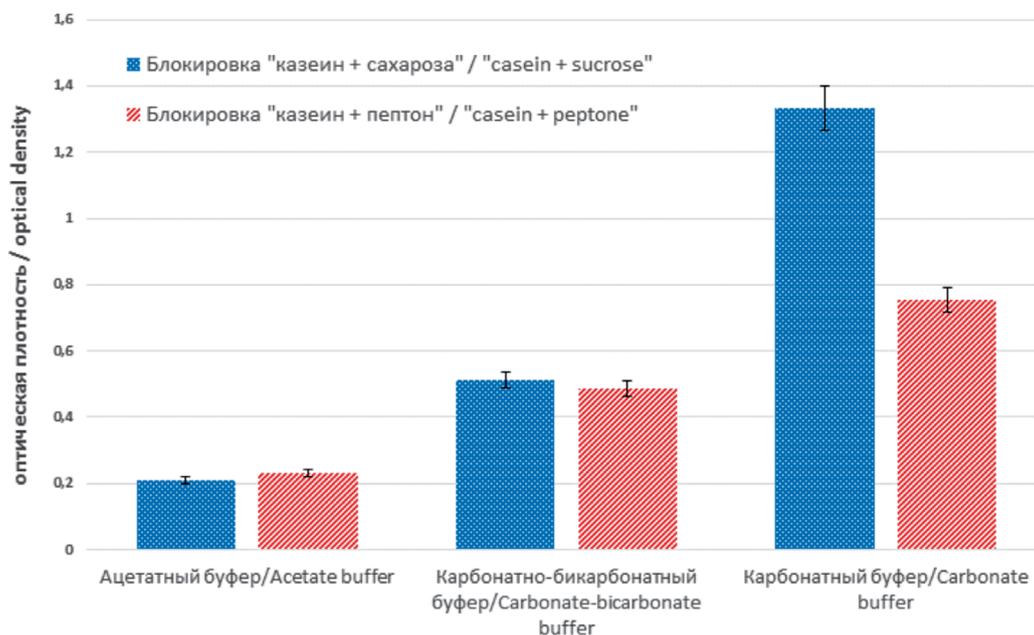


Рис. 4. Результаты иммуноферментного анализа для определения оптимальных условий для сорбции рекомбинантного антигена вируса жёлтой лихорадки (разведение сыворотки крови 1 : 100).

Fig. 4. The results of ELISA performed to determine the optimal conditions for the sorption of the recombinant YFV antigen (dilution of blood serum 1 : 100).

стве блокирующих буферов использовали два варианта растворов казеина – с сахарозой или пептоном. Далее был проведён ИФА с использованием сыворотки крови (в разведении 1 : 100), имеющей антитела к ВЖЛ.

Как показано на графике (рис. 4), при использовании ацетатного сорбционного буфера оптическая плотность при образовании иммунных комплексов рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ составляла 0,209 о.е. при использовании блокирующего раствора «казеин + сахароза», а с блокирующим раствором «казеин + пептон» – 0,230 о.е. При сорбировании рекомбинантного антигена с использованием карбонатного буфера и блокировки раствором «казеин + сахароза» чувствительность достигала 1,333 о.е., а при блокировании раствором «казеин + пептон» – 0,753 о.е. Аналогичные показатели для карбонатно-бикарбонатного буфера составляли 0,512 и 0,487 о.е. для блокирующих растворов «казеин + сахароза» и «казеин + пептон» соответственно. Таким образом, было показано, что оптимальными условиями для обеспечения высокого уровня специфичности рекомбинантного антигена и антител к ВЖЛ является использование карбонатного сорбционного буфера и блокирующего раствора, в состав которого входят казеин и сахароза.

Оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного аналога третьего домена белка Е ВЖЛ проведена с использованием сформированной панели образцов сывороток крови людей (табл. 3).

Диагностическую чувствительность определяли с использованием панели сывороток крови людей, вакцинированных против ВЖЛ, при проведении ИФА

с применением анти-IgG-конъюгата. Положительный результат выявлен в 100% случаев. Таким образом, диагностическая чувствительность сконструированного нами экспериментального набора реагентов для выявления IgG к ВЖЛ составила не менее 98% с доверительной вероятностью 90%.

Для определения специфичности разработанной методики тестировали сыворотки крови людей, которые не были вакцинированы против ЖЛ. При исследовании всех образцов был получен отрицательный результат. Диагностическая специфичность составила не менее 99%.

В твердофазном ИФА все пробы от вакцинированных против ВЖЛ были положительными, и величина оптической плотности (ОП) колебалась от 0,599 до 2,820 (при ОП_{крит.} = 0,260). Положительных образцов среди групп сравнения не выявлено.

Проведено сравнение эффективности коммерческого набора реагентов Human Yellow FeverVirusIgG (YFV-IgG) (Abbexa, Великобритания) и экспериментальной ИФА тест-системы. Для этого использовали 30 сывороток крови, полученных от вакцинированных против ВЖЛ в разные годы, 1 – от пациента с диагнозом «лихорадка денге», 1 – от пациента с диагнозом «гепатит С» и 1 – от пациента с отсутствием антител к вышеперечисленным вирусам. Сыворотки тестировали в разведении 1 : 100. При анализе сывороток, содержащих антитела к ВЖЛ, как с использованием коммерческого набора, так и разработанного нами лабораторного варианта ИФА тест-системы иммуноглобулины класса IgG к ВЖЛ были обнаружены во всех исследуемых пробах. Сыворотки сравнения

показали отрицательный результат при их исследовании двумя тест-системами.

Апробация экспериментальной тест-системы была проведена на 250 образцах сывороток крови жителей Гвинейской Республики, которая является эндемичной по ЖЛ и в которой ежегодно регистрируются случаи заболеваний. В связи с тем, что на данной территории широко распространены и возбудители малярии, полученный материал перед основными исследованиями был протестирован методом ИХА для выявления антигенов малярийных плазмодиев с наборами реагентов SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan (Standart Diagnostics, Inc., Республика Южная Корея). Образцы, в которых присутствовали антигены возбудителей малярии, в последующую работу не были включены для исключения получения неспецифических результатов. При проведении исследований было выявлено 34,8% положительных проб, содержащих антитела класса IgG к ВЖЛ.

Заключение

В результате проведенных исследований была сконструирована плаزمид, содержащая фрагмент гена иммуногенного белка Е ВЖЛ в бактериальной системе *E. coli*, на основании которой создан штамм-продуцент белка, содержащего антигенные детерминанты ВЖЛ, и получен рекомбинантный антиген. Специфичность и чувствительность полученных препаратов подтверждена иммунологическими методами, в результате показано, что искусственно созданный аналог белка Е обладает антигенными свойствами и даёт возможность определять специфические антитела к ВЖЛ в сыворотках вакцинированных людей. Показано, что полученный рекомбинантный антиген не имеет перекрёстных реакций с другими флавивирусами (вирусами денге, клещевого энцефалита и гепатита С).

Таким образом, был разработан способ выявления специфических антител класса IgG к белку Е ВЖЛ методом ИФА, проведена оптимизация условий анализа, сконструированы экспериментальные серии препарата. Данный диагностический набор может быть использован для изучения протективных свойств вакцины от ЖЛ, а также для идентификации случаев инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Health topic. Yellow fever. Available at: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever>
2. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология: руководство*. М.: МИА; 2008.
3. Lindenbach B.D., Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 23–61. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59002-9)
4. Douam F., Ploss A. Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* 2018; 26(11): 913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>
5. Monath T.P. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2001; 1(1): 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
6. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L. и *Aedes albopictus* skuse – новая биологическая угроза для юга России. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2012; (3): 49–55.
7. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжоннова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* на тер-

- ритории Российской Федерации. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2012; (1): 3–4.
8. Коваленко И.С., Якунин С.Н., Абибулаев Д.Э., Владычак В.В., Бородай Н.В., Смелянский В.П. и др. Обнаружение *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) в Крыму. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 135–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-135-137>
9. Ясюкевич В.В., Попов И.О., Титкина С.Н., Ясюкевич Н.В. Адвентивные виды *Aedes* на территории России – оценка риска новой биологической угрозы здоровью населения России. *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. 2017; 28(3): 51–71. <https://doi.org/10.21513/0207-2564-2017-3-51-71>
10. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Удмуртской Республике. О профилактике желтой лихорадки; 2022. Available at: <https://18.rospotrebnadzor.ru/content/354/110271/>
11. Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В. Современные лабораторные методы выявления возбудителя желтой лихорадки. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (2): 24–32. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-202-2-21-32>
12. Heinz F.X., Stiasny K., Püschner-Auer G., Holzmann H., Allison S.L., Mandl C.W., et al. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. 1994; 198(1): 109–17. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>
13. Chávez J.H., Silva J.R., Amarilla A.A., Moraes Figueiredo L.T. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*. 2010; 38(6): 613–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.07.004>
14. Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009; 394(1): 12–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.001>
15. Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г. Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Новосибирск: ЦЭРИС; 2009.
16. Marshall O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004; 20(15): 2471–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
17. National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
18. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8): 1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

REFERENCES

1. WHO. Health topic. Yellow fever. Available at: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever>
2. L'vov D.K., ed. *Medical Virology: Manual [Meditsinskaya virusologiya: rukovodstvo]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
3. Lindenbach B.D., Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 23–61. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59002-9)
4. Douam F., Ploss A. Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* 2018; 26(11): 913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>
5. Monath T.P. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2001; 1(1): 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
6. Ganushkina L.A., Dremova V.P. Mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* skuse – a new biological threat to the south of Russia. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2012; (3): 49–55. (in Russian)
7. Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. On the detection of *Aedes (Stegomyia) albopictus* mosquitoes on

- the territory of the Russian Federation. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2012; (1): 3–4. (in Russian)
8. Kovalenko I.S., Yakunin S.N., Abibulaev D.E., Vladychak V.V., Boroday N.V., Smelyanskiy V.P., et al. Obnaruzhenie Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1895) v Krymu. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (2): 135–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-135-137> (in Russian)
 9. Yasyukevich V.V., Popov I.O., Titkina S.N., Yasyukevich N.V. Adventive species of Aedes in Russia – the risk assessment of a new biological threat to the health of the population of Russia. *Problemy ekologicheskogo monitoringa i modelirovaniya ekosistem*. 2017; 28(3): 51–71. <https://doi.org/10.21513/0207-2564-2017-3-51-71> (in Russian)
 10. Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Udmurt Republic. On the prevention of yellow fever; 2022. Available at: <https://18.rosпотреbnadzor.ru/content/354/110271/> (in Russian)
 11. Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naydenova E.V. Advanced laboratory methods for detecting yellow fever pathogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (2): 24–32. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-202-2-21-32> (in Russian)
 12. Heinz F.X., Stiasny K., Püschner-Auer G., Holzmann H., Allison S.L., Mandl C.W., et al. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. 1994; 198(1): 109–17. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>
 13. Chávez J.H., Silva J.R., Amarilla A.A., Moraes Figueiredo L.T. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*. 2010; 38(6): 613–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.07.004>
 14. Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009; 394(1): 12–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.001>
 15. Radaeva I.F., Nechaeva E.A., Drozdov I.G. *Collection of Cell Cultures of the Federal State Budgetary Institution of the World Bank «Vector» of Rospotrebnadzor [Kollektsiya kul'tur kletok FBUN GNTs VB «Vektor» Rospotrebnadzora]*. Novosibirsk: TsERIS; 2009. (in Russian)
 16. Marshall O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004; 20(15): 2471–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
 17. National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
 18. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Uni-pro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8): 1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
 19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii

ISSN 0507-4088. Вопр. вирусологии. 2022. Т. 67. № 4. 259-350.