

*На правах рукописи*

Козлова Алина Александровна

ИЗУЧЕНИЕ АРЕАЛА ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА  
В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) в подразделении «Институт вирусологии имени Д.И.Ивановского»

**Научный руководитель:**

**Бутенко Александр Михайлович** - профессор, доктор биологических наук, руководитель отдела арбовирусов, заведующий лабораторией биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Борисевич Сергей Владимирович** - профессор, доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, член-корреспондент РАН, начальник ФГБУ «48 Центральный НИИ» Министерства обороны России

**Локтев Валерий Борисович** - профессор, доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» (ФГУП «ГосНИИБП») Федерального медико-биологического агентства России

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.130.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра [www.gamaleya.org](http://www.gamaleya.org)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Елена Ивановна Бурцева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Актуальность проблемы арбовирусных инфекций определяется их глобальным распространением, масштабами эпидемий и эпизоотий, тяжестью клинических проявлений, высокой летальностью, отсутствием этиотропных средств лечения, ограниченным ассортиментом эффективных вакцин и диагностических тест-систем, что связано с огромным разнообразием возбудителей и открытием новых патогенных агентов и нозологических форм заболеваний [Д. К. Львов, С. М. Клименко, С. Я. Гайдамович, 1989 г.]. Особое внимание привлекает процесс распространения многих арбовирусов на неэндемичные территории мира, с чем связано возникновение эпидемий лихорадки Западного Нила (ЛЗН), лихорадки Зика и Чикунгунья в Америке, расширения ареала японского энцефалита, появление эпидемических вспышек лихорадки денге и Чикунгунья в Европе. Ареал вируса Западного Нила (ЗН) по сравнению с прочими арбовирусами, не имеет аналогов и охватывает Африку, южные и центральные регионы Европы, Центральную, Южную, Юго-Восточную Азию, Ближний Восток, Океанию, Австралию, большую часть территории США, южные провинции Канады, Центральную и Южную Америку. Среди зоонозных вирусных инфекций, эндемичных для России, ЛЗН имеет важное эпидемиологическое значение наряду с Крымской-Конго геморрагической лихорадкой (ККГЛ), клещевым энцефалитом (КЭ) и геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС). Вирус ЗН впервые в СССР был выделен из преимаго клещей *Nyalomma marginatum*, собранных в 1963 г. в Астраханской области, где в 1967 г. было верифицировано 11 случаев ЛЗН. В 1999 г. первая эпидемическая эпидемия ЛЗН наблюдалась на юге Европейской части РФ, когда в Астраханской, Волгоградской областях и Краснодарском крае было зарегистрировано 560 подтвержденных случаев. В 2000 г. случаи ЛЗН были выявлены в Ростовской области, в 2010 гг. в Воронежской и Саратовской областях, в 2012 г. в Липецкой, Самарской, Белгородской и Тульской областях.

Актуальное значение приобрели исследования, направленные на мониторинг циркуляции вируса ЗН в эндемичных регионах страны и сопредельных территориях с целью определения современного ареала ЛЗН. Решения этого вопроса во многом основывается на результатах серологических и вирусологических исследований. При выполнении настоящей работы существенную роль имели методологические аспекты, важные для интерпретации полученных результатов. Первый связан с наличием антигенных связей, выявляемых между флавивирусами. В этой связи, сыворотки жителей регионов, эндемичных по клещевому энцефалиту были обследованы методом ИФА-IgG с антигенами вирусов ЗН и клещевого энцефалита, а также в реакции нейтрализации с вирусом ЗН.

Второй аспект заключался в необходимости изучения персистенции специфических IgM, IgG и нейтрализующих антител у больных ЛЗН и реконвалесцентов, с целью определения пригодности методов ИФА-IgM, ИФА-IgG и реакции нейтрализации (РН) для выявления ранних и анамнестических антител к вирусу ЗН.

Представлялось целесообразным проведение вирусологического обследования клинических материалов, собранных от больных лихорадочными заболеваниями неясной этиологии в

Астраханской области и пациентов, возвратившихся в Москву из эндемичных по ЛЗН регионов мира, для получения дополнительной информации о циркуляции и ареале вируса ЗН и выявления циркуляции других арбовирусных агентов.

### **Цель исследования**

Изучение ареала вируса ЛЗН на территории Европейской части РФ по данным серологических исследований. Решение методических вопросов, имеющих отношение к этой теме. Вирусологическая диагностика ЛЗН и других арбовирусных заболеваний.

### **Задачи исследования**

1. Обследование сывороток крови населения, проживающего на территориях различных ландшафтно-климатических зон Европейской части России на IgG, IgM и нейтрализующие антитела к вирусу ЗН.
2. Серологическая диагностика случаев ЛЗН на территориях, благополучных по этой инфекции. Применение альтернативных методов ИФА-IgM, ИФА-IgG и РН для подтверждения достоверности и специфичности выявляемых антител к вирусу ЗН.
3. Изучение динамики специфических IgM, IgG и нейтрализующих антител у больных ЛЗН и реконвалесцентов.
4. Вирусологическое обследование больных острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии.

### **Научная новизна**

Впервые с применением методов ИФА-IgG, ИФА-IgM и РН проведены широкие сероэпидемиологические исследования, направленные на изучение ареала вируса ЗН на территориях Европейской части России, общей площадью 907,3 тыс. км<sup>2</sup> с населением более 49 млн. человек. Полученные данные в сочетании со статистикой заболеваемости свидетельствуют об активности очагов ЛЗН в Южном, Северо-Кавказском, Приволжском, Центральном округах (лесостепная зона и Тульская область). Результаты обследования сывороток доноров из Калужской, Рязанской, Московской, Тверской, Вологодской и Ульяновской областей и Татарстана, оказались отрицательными. Установлено, что современная северная граница ареала вируса Западного Нила находится на широте Тульской области.

В результате обследования методами ИФА и РН сывороток крови 132 больных острыми сезонными лихорадочными заболеваниями среди жителей Тульской области впервые верифицированы 4 случая ЛЗН.

Установлено отсутствие специфических IgM антител у реконвалесцентов, обследованных через 243-358 дней после начала заболевания ЛЗН, при сохранении IgG антител в 88,5% случаев и нейтрализующих антител в 91,7%. Эти данные подтверждают адекватность принятой в РФ тактики серологической диагностики ЛЗН, основанной на применении метода ИФА-IgM и целесообразность использования ИФА-IgG и РН для проведения сероэпидемиологических исследований.

В результате вирусологического обследования клинических материалов, собранных от лихорадящих больных в Астраханской области и пациентов, возвратившихся в Москву после посещения других регионов мира, эндемичных по ЛЗН, выделены и идентифицированы: 1 штамм вируса ЗН, 6 штаммов вируса ККГЛ, 17 штаммов вируса денге, 2 штамма вируса Зика и один штамм вируса Чикунгунья.

Данные по идентификации штаммов вирусов денге, выделенных от граждан РФ, возвратившихся в Москву из поездок в страны Юго-Восточной Азии, указывают на доминирующую циркуляцию вирусов денге 1 и 2, что совпадает с результатами зарубежных исследований. Выделение шести штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа 1 и штамма вируса ЗН генотипа 1a подтверждают факт стабильности генетических популяций генотипов этих вирусов в Астраханской области на протяжении пятидесяти с лишним лет. Эти же данные, очевидно, свидетельствуют о низкой циркуляции вируса ЗН в тропических странах.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическое значение имеют результаты, указывающие на расширение ареала вируса ЗН на территории Европейской части России. Важным свидетельством продвижения границ циркуляции вируса ЗН в северном направлении является выявление случаев ЛЗН, впервые верифицированных нами в Тульской области. Результаты серологического обследования населения более северных областей (Калужская, Рязанская, Московская, Тверская, Вологодская) и более восточных территорий (Ульяновская область и Татарстан) оказались отрицательными.

Данные по обследованию сывороток крови больных ЛЗН на специфические IgM, IgG и нейтрализующие антитела в течение 3-18 дней заболевания и в период поздней реконвалесценции носят теоретический и практический характер, т. к. они расширяют сведения о динамике гуморального иммунитета и подтверждают адекватность принятой в РФ тактики серологической диагностики ЛЗН, основанной на применении метода ИФА-IgM, а ИФА-IgG и РН для проведения сероэпидемиологических исследований.

Штаммы вирусов ЗН, ККГЛ, Зика, Чикунгунья и денге, выделенные в процессе вирусологического обследования клинических материалов от больных острыми лихорадочными заболеваниями могут быть использованы для проведения филогенетических исследований и совершенствования диагностических тест-систем. Полученные данные дополняют информацию об ареалах этих инфекций.

Разработан набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, ЗН и Чикунгунья методом ИФА «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чикунгунья». Регистрационное удостоверение на медицинское изделие РЗН 2018/7810 от 26 ноября 2018 года. Диссертант является соавтором удостоверений о депонировании 8 новых штаммов арбовирусов в Госколлекции вирусов и Генбанке (Genbank).

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В результате обследования методами ИФА-IgG и РН 6341 пробы сывороток крови населения пяти федеральных округов антитела к вирусу ЗН обнаружены в Ставропольском, Краснодарском крае, Астраханской, Саратовской, Воронежской, Тульской, Тамбовской и

Липецкой областях, что свидетельствуют о расширении очагов этой инфекции на территории Европейской части РФ.

2. С использованием методов ИФА-IgM, ИФА-IgG и РН впервые диагностированы 4 случая лихорадки ЗН в Тульской области.

3. Учитывая наличие антигенных связей между вирусами ЗН и клещевого энцефалита, выявляемых методом ИФА-IgG, сыворотки жителей регионов, эндемичных по клещевому энцефалиту, необходимо параллельно обследовать на антитела к этим вирусам как в ИФА-IgG, так и в РН.

4. Специфические IgM антитела к вирусу ЗН, присутствующие у всех 26 обследованных больных ЛЗН на 3-18 дни заболевания, не обнаруживаются в период поздней реконвалесценции, при сохранении IgG (в 88,5% случаев) и нейтрализующих антител (в 91,7%), что подтверждает пригодность методов ИФА-IgG и реакции нейтрализации для проведения сероэпидемиологических исследований.

5. В результате вирусологического обследования клинических материалов, собранных от лихорадящих больных в Астраханской области или пациентов, возвратившихся в Москву после посещения других регионов мира, эндемичных по ЛЗН, были выделены и идентифицированы: 1 штамм вируса ЗН, 6 штаммов вируса ККГЛ, 17 штаммов вируса денге, 2 штамма вируса Зика и один штамм вируса Чикунгунья. Выделение штаммов вирусов ККГЛ генотипа Европа 1 и вируса ЗН генотипа 1a подтверждает факт стабильности генетических популяций этих вирусов в Астраханской области в течении более пятидесяти лет. Эти данные указывают, очевидно, на низкую активность циркуляции вируса ЗН в тропических странах Ю. Америки и Ю.В. Азии.

**Достоверность результатов исследований** обеспечена репрезентативным количеством обследованных сывороток крови населения, собранных в регионах Европейской части РФ; использованием альтернативных серологических методов с целью верификации специфичности антител к вирусу ЗН; анализом сероэпидемиологических данных и показателей заболеваемости ЛЗН; применением современной аппаратуры и сертифицированных реактивов для проведения исследований, серологических и молекулярно-генетических методов идентификации выделенных штаммов; результатами статистической обработки данных.

### **Внедрение результатов исследования**

Полученные результаты могут быть использованы при подготовке рекомендаций по мониторингу территорий с целью выявления (или отсутствия) циркуляции вируса ЗН. Они должны предусматривать необходимость обследования репрезентативного числа доноров; применение альтернативных методов ИФА-IgG и РН для подтверждения специфичности результатов; необходимость параллельного тестирования сывороток доноров в регионах, эндемичных по клещевому энцефалиту, методами ИФА-IgG и РН на антитела к вирусам клещевого энцефалита и ЗН; сравнительный анализ данных сероэпидемиологических исследований и заболеваемости ЛЗН.

Данные по изучению персистенции специфических IgM, IgG и нейтрализующих антител у больных лихорадкой ЗН и реконвалесцентов подтверждают адекватность принятой в РФ тактики

серологической диагностики этого заболевания, основанной на применении метода ИФА-IgM, а так же ИФА-IgG и РН для проведения сероэпидемиологических исследований.

Штаммы арбовирусов, выделенные в процессе выполнения работы используются для проведения филогенетических исследований. Полученные данные включены в курс лекций «Арбовирусы и арбовирусные инфекции» на кафедре инфектологии и вирусологии ИПО ФГАО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова», а также внедрены в схему специфической диагностики острых лихорадочных заболеваний неясной этиологии в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больницы №1 Департамента здравоохранения г. Москвы».

**Методология и методы исследований** основывались на анализе данных литературы и методических рекомендаций, посвященных вопросам этиологии и специфической диагностики арбовирусных инфекций. В процессе выполнения работы были использованы серологические методы, выделение вирусов на нбм и клеточных культурах, идентификация выделенных агентов с применением методов ИФА, ОТ-ПЦР и секвенирования геномов, а так же стандартных технологий приготовления компонентов ИФА-тест систем.

### **Апробация работы**

Результаты работы представлены на следующих конференциях, совещаниях и заседаниях:

1. Конференции Проблемной комиссии РАМН «Арбовирусы и другие вирусы зоонозов», 16 марта 2014 г. «Актуальные вопросы изучения лихорадки Западного Нила и лихорадки денге в Российской Федерации», НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздрава РФ.

2. Межведомственном совещание «Чувствительность, специфичность и эффективность иммунодиагностических тест-систем для обнаружения возбудителя ЛЗН, а также тактики их использования для диагностики ЛЗН», Волгоград, 19 июня 2014 г.

3. Межведомственной конференция «Эндемичные и завозные арбовирусные инфекции в Российской Федерации», 24-25 ноября 2015 г. подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ

4. Заседании Ученого совета «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 28 мая 2015 г.

5. Заседании Отдела арбовирусов подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 18 декабря 2019 г.

6. Заседании апробационного совета подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 25 декабря 2019 г.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют п/п 8, 9, 10 формулы специальности 03.02.02 – вирусология (биологические науки).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемом научном издании,

рекомендованном ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований.

### **Личный вклад соискателя**

Основные разделы диссертационной работы (серологические и вирусологические исследования, статистическая обработка результатов) выполнены автором лично. Сыворотки крови доноров-жителей Европейской части РФ и больных, госпитализированных с подозрением на ЛЗН и другие арбовирусные инфекции, были получены в рамках сотрудничества с лечебными и научными учреждениями различных регионов РФ. Молекулярно-генетическая характеристика выделенных арбовирусов ЗН, выполнена с.н.с. лаборатории биологии и индикации арбовирусов А. С. Климентовым, сотрудниками лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных организмов (заведующий - В. А. Гуцин), лаборатории молекулярной генетики (заведующий - А. Г. Прилипов) и лаборатории биотехнологии (заведующий – С. В. Альховский). Помощь в статистической обработке данных оказали научный сотрудник лаборатории неспецифической профилактики инфекционных заболеваний И. С. Шмыр и сотрудница лаборатории трансляционной биомедицины Д. В. Васина, за что приношу им глубокую благодарность.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы (48 отечественных и 125 зарубежных источников). Общий объем работы составляет 139 страниц машинописного текста, включающего 26 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

#### **Вирусы и штаммы, использованные в работе**

Для постановки реакции нейтрализации, приготовления специфических вирусных антигенов и получения иммуноглобулинов использовали вирусы ЗН (штамм Аст 986 генотипа 1а, выделенный из крови больного ЛЗН в Астраханской области), клещевого энцефалита (штамм 4072, сибирский генотип) и Усуту (штамм SAAr 1776).

#### **Сыворотки крови**

В процессе работы были обследованы в общей сложности 6341 проба сывороток крови доноров, полученных из Астраханской области (657 проб), Ставропольского края (56), Краснодарского края (243), Саратовской (1448), Воронежской (128), Калужской (52), Липецкой (614), Курской (61), Вологодской областей (203), Москвы (424), Московской области (140), Рязанской (124), Тамбовской (1023), Тверской (97), Тульской (400), Ульяновской областей (471) и Татарстана (200). Пробы для серологического обследования были предоставлены Т. К. Дзагуровой (ФНЦРИП им. М. П. Чумакова РАН), А. Р. Азарян, А. П. Гришановой, Е. И.



Иващенко, Г. Л. Шендо (ЦГиЭ в Астраханской области), О. М. Пиликовой (Причерноморская ПЧС, г. Новороссийск), Н. Ф. Василенко (Ставропольский ПЧИ), С. М. Елисеевой (ЦГиЭ в Тверской области), Д. М. Зорина (ЦГиЭ в Вологодской области), М. И. Корабельниковой, Е. Н. Кудрявцевой (ГБУЗ МОНИКИ), С. Д. Лебедевой (ЦГиЭ в Республике Татарстан), М. В. Лесниковой («Интер-Фарм Вологда»), Н. В. Недилия (ЦГиЭ в Рязанской области), М.В.Соколовой (ИКБ №1 г. Москвы).

Методом заражения нбм было обследовано 176 сывороток крови больных острыми вирусными заболеваниями неясной этиологии, полученных из ЦГиЭ в Астраханской области и Астраханской областной инфекционной больницы им. А. Н. Ничоги; пробы крови (59), слюны (2) и мочи (6), взятые у больных, госпитализированных в ИКБ №1 г. Москвы после поездок в тропические страны (243 пробы). Эти пробы были предоставлены М. А. Сайфуллиным. Выражаю всем глубокую благодарность за предоставление этих материалов.

### **Реакция нейтрализации**

Выполняли микрометодом в 96-луночных планшетах в перевиваемой культуре клеток Vero E6. Положительные сыворотки из числа обследованных в ИФА-IgG и РН на антитела к вирусу ЗН тестировали на антитела к флавивирусам клещевого энцефалита и Усуту.

### **Приготовление антигенов, иммунных асцитных жидкостей и конъюгатов**

Антигены готовили методом сахарозо-ацетоновой экстракции из мозговой ткани нбм, зараженных вирусом ЗН, КЭ и Усуту.

Иммунные асцитные жидкости получали путем внутрибрюшинного заражения взрослых белых мышей 10%-мозговой вирусосодержащей суспензией мозга нбм с последующим введением клеток саркомы мышей TG-180 [Ред. Д.К. Львов Методические рекомендации. Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территории РФ с целью противоэпидемической защиты населения и войск, М., 1993]. Выделение иммуноглобулинов класса G из иммунных асцитных жидкостей проводили методом аффинной хроматографии в колонке с протеин-А-сефарозой Ch-4B (Pharmacia). Конъюгаты получали методом периодатного окисления.

### **Иммуноферментный анализ**

Оценку активности и специфичности полученных антигенов, глобулинов и конъюгатов, а также выявление вирусных IgM и IgG антител к ним в исследуемом материале проводили методом ИФА [Calisher C.H. et al, 1986; Meegan J.M. et al, 1989].

### **Вирусологическое обследование клинических материалов**

Выделение вирусов проводили методом интрацеребрального заражения нбм (в возрасте 1-3 дня), в некоторых случаях путем заражения культуры клеток VERO E6 с последующей инокуляцией нбм пробами культуральной жидкости инфицированных культур [Ред. Львов Д.К. Методические рекомендации. Организация эколого-эпидемиологического мониторинга

территории Российской Федерации с целью противоэпидемической защиты населения и войск, М., 1993].

### **Статистический анализ результатов**

Статистический анализ полученных результатов проводился в программах MS Excel 2007 и GraphPad Prism 6. При обработке данных обследования сывороток крови рассчитывали средние геометрические титров антител, среднеквадратичные отклонения, доверительные интервалы методом Клоппера-Пирсона. Для оценки достоверности различий результатов обследования разных групп населения использовали критерии Фишера и Манна-Уитни. Статистически значимыми принимались различия при  $p < 0,05$ . Для сравнительного анализа результатов обнаружения антител методами ИФА и РН использовался критерий Уилкоксона (Стэнтон Г., 1999).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Результаты обследования сывороток крови населения Европейской части России на антитела к вирусу ЗН**

Первые случаи лихорадки ЗН в Астраханской области были верифицированы в 1967 г., в 1999 г. Волгоградской области и Краснодарском крае, в 2000 г. в Ростовской области, в 2010 г. в Воронежской и Саратовской областях, в 2012 г. в Липецкой, Самарской, Белгородской (интернет-информация Роспотребнадзора) и Тульской областях, в 2015 г. в Ставропольском крае и Дагестане (интернет-информация Роспотребнадзора). С 1999 по 2015 годы в РФ было зарегистрировано примерно 2400 случаев ЛЗН. Данные о заболеваемости свидетельствовали о необходимости дальнейшего уточнения ареала этой инфекции. Важное значение имеют результаты сероэпидемиологического обследования населения. Предшествующие сведения по этому вопросу довольно ограничены (за исключением данных по Астраханской и Волгоградской областям).

Ниже приводятся данные обследования 6341 проб сывороток населения, проживающего на территориях пяти Федеральных округов. Ставропольский и Краснодарский края находятся в степной, полупустынной, лесолуговой и субтропических зонах, Саратовская область в зонах лесостепей и степей, Воронежская, Курская, Липецкая и Тамбовская области в пределах лесостепной зоны, Тульская область в зоне лиственных лесов, Ульяновская область в лесостепной зоне и зоне лиственных лесов, Рязанская, Калужская, Московская, Тверская области и Республика Татарстан в границах поясов южно-таежных и лиственных лесов, Вологодская область в лесных зонах средне-таежного и южно-таежного типов.

### **Южный федеральный округ**

#### **Астраханская область**

При обследовании 657 сывороток крови доноров, полученных из 12 сельских районов Астраханской области и г. Астрахани, антитела к вирусу ЗН были обнаружены в 129 пробах

(19,6%). В РН из 588 проставленных сывороток положительными оказались 88 (15,0%), в ИФА-IgG - 129 из 657 (19,6%). Совпадение положительных результатов РН и ИФА-IgG составило 80,7%.

Антитела к вирусу ЗН обнаружены у жителей в г. Астрахани, Володарского, Икрянинского, Камызякского, Красноярского, Лиманского, Наримановского, Приволжского и Енотаевского районов.

В сыворотках крови жителей 12 сельских районов дельты Волги и 291 пробы сывороток жителей Астрахани антитела к вирусу ЗН были обнаружены соответственно в 11,7 и 26,1% ( $p < 0,05$ ). Показатели обнаружения антител у мужчин и женщин оказались практически одинаковыми, соответственно 20,2 и 18,0% ( $p > 0,05$ ). В возрастных группах 30-39 лет и 40-49 лет – 32,9 и 22,8% ( $p > 0,05$ ).

Пять сывороток серопозитивных доноров из Астраханской области, содержащих нейтрализующие антитела к вирусу ЗН, были обследованы в реакции нейтрализации с вирусами ЗН и Усуту, таксономически родственному вирусу ЗН, распространенному в Африке, Южной и Центральной Европе. Результаты опыта подтвердили специфичность антител к вирусу ЗН.

В качестве примера, иллюстрирующего активность IgG и нейтрализующих антител в сыворотках крови доноров из Астраханской области, приводятся титры IgG и нейтрализующих антител в положительных пробах (Таблица 1).

Средние геометрические титров ИФА-IgG и нейтрализующих антител к вирусу ЗН составляли соответственно 1:391 и 1:116 ( $p < 0,0001$ ). Между результатами обследования сывороток крови мужчин и женщин не было выявлено достоверных отличий ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 1 - Титрование сывороток крови доноров из Астраханской области (2011 г.) на антитела к вирусу ЗН в ИФА-IgG и реакции нейтрализации**

№№ сывороток	Титры антител	
	в ИФА-IgG	в РН
479	1:200	1:40
481	1:400	1:80
486	1:200	1:1280
487	1:200	1:160
492	1:400	1:80
500	1:400	1:40
506	1:400	1:20
517	1:200	1:20
519	1:400	1:640
541	1:400	1:320
545	1:400	1:80
547	1:200	1:40
551	1:800	1:320
560	1:400	1:40
562	1:200	1:20
571	1:1600	1:160
580	1:200	1:320
582	1:800	1:80
583	1:800	1:320
588	1:400	1:160
593	1:800	1:160
601	1:200	1:80
610	1:400	1:640

## Продолжение Таблицы 1

611	1:1600	1:80
614	1:100	1:20
631	1:1600	1:160
633	1:400	1:320
634	1:200	1:80
663	1:400	1:320
669	1:100	1:40
673	1:800	1:160
674	1:800	1:320
<b>Средние геометрические титров</b>	<b>1: 391</b>	<b>1:116</b>

## Ростовская область

Для подтверждения специфичности антител к вирусу ЗН, выявляемых у больных с подтвержденным диагнозом ЛЗН из Ростовской области, сыворотки крови 11 пациентов были обследованы методом МАС-ELISA с антигенами вирусов ЗН и Усуту. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антитела, обнаруженные у этих лиц, появились в результате инфицирования вирусом ЗН, но не вирусом Усуту.

## Краснодарский край

В Краснодарском крае среди 243 сывороток доноров было выявлено 11 (4,5%) проб, содержащих антитела к вирусу ЗН: 11 в ИФА IgG (4,5%) и 9 в РН (3,7%). Процент совпадения положительных результатов по двум реакциям составил 72,2%.

У мужчин антитела встречались в 4,1% случаев, среди женщин в 3,6% ( $p>0,05$ ).

Титры IgG во всех случаях значительно превышали титры нейтрализующих антител ( $P<0,0001$ ). Средние геометрические титров IgG и нейтрализующих антител к вирусу ЗН составляли соответственно  $8,9 \log_2$  (1:548) и  $6,4 \log_2$  (1:103) (Таблица 2). Между результатами обследования сывороток мужчин и женщин не было выявлено достоверных отличий ( $p>0,05$ ).

**Таблица 2 - Титрование сывороток крови жителей Краснодарского края (2012 г.) на антитела к вирусу ЗН в ИФА-IgG и реакции нейтрализации**

№№ сывороток	Титры антител	
	в ИФА-IgG	в РН
28	1:1600	1:160
71	1:100	1:20
98	1:800	1:160
135	1:100	отр
162	1:3200	1:320
183	1:3200	1:1280
188	1:400	1:20
195	1:200	отр
206	1:200	1:40
221	1:1600	отр
223	1:400	1:80
<b>Средние геометрические титров</b>	<b>1: 548</b>	<b>1:104</b>

## Северо-Кавказский федеральный округ

### Ставропольский край

Единичные пробы сывороток (n=56) были получены из городов Ставрополя и Кисловодска и 17 сельских районов края. Положительными оказались 3 пробы (5,4%). IgG антитела к вирусу ЗН обнаружены у двух (3,6%) жителей Ипатовского района, нейтрализующие - у одного жителя (1,8%) Левокумского района. Процент серопозитивных находок среди женщин составил 6,7%, среди мужчин - 3,4% ( $p > 0,05$ ).

## Приволжский федеральный округ

### Саратовская область

В результате обследования 1448 сывороток крови, полученных из 14 районов Саратовской области, IgG антитела к вирусу ЗН были обнаружены в 13 сыворотках (0,9%). Девять из них (0,6%) оказались положительными и в РН. Процент совпадения результатов двух реакций составил 69,2%. Положительные находки выявлены у жителей 7 районов: Базарно-Карабулакском (4,5%), Воскресенском (1,6%), Аткарском (1,1%), Балтайском (1,0%), Калининском (0,9%), Романовском (0,9%), Саратовском (0,8%). В возрастных группах населения от 19 до 29, 30-49, 50-69, 70-89 лет антитела к вирусу ЗН встречались соответственно в 0,6; 0,9; 1,0; 2,2 % ( $p > 0,05$ ), у мужчин – в 0,7% случаев, у женщин – в 0,8% ( $p > 0,05$ ).

Титры специфических IgG у серопозитивных доноров из Саратовской области во всех случаях значительно превышали титры нейтрализующих антител ( $p < 0,0001$ ). Средние геометрические титры IgG составляли 1:844, нейтрализующих - 1:86.

### Ульяновская область

Из Ульяновской области была получена 471 сыворотка крови: 416 из Димитровградского района, 21 из Инземского района, 11 из шести других сельских районов. Адреса 23 доноров установить не удалось. Результаты обследования на антитела к вирусу ЗН методами ИФА-IgG и РН оказались отрицательными.

## Республика Татарстан

Распределение 200 обследованных сывороток по территории Республики было следующим: Арский район – 19, Высокогорский район – 20, Кукморский район – 108, Сабинский район – 7, три других района – 4; по возрастным группам : от 4 до 12 лет – 42, от 15 до 18 лет – 34, от 21 до 30 – 43, от 31 до 40 – 40, от 41 до 50 – 34 и старше – 7. Результаты во всех случаях оказались отрицательными.

## Центральный федеральный округ

### Воронежская область

Из 128 сывороток крови доноров, полученных из Терновского и Верхнехавского района области, две пробы (1,6%) содержали нейтрализующие антитела к вирусу ЗН, одна из них (0,8%) – специфические IgG (в титре 1:400). Среди обследованных лиц в возрасте до 29 лет (n=33), 30-

49 лет (n=43), 50 и более лет (52) по одной серопозитивной находке обнаружено в группах 20-29 и 30-39 лет (соответственно в 3,0% и 2,3%) ( $p>0,05$ ). Не удалось установить адреса и возраст 21-го и пол 35-и доноров.

### **Курская область**

Результаты обследования на антитела к вирусу ЗН 61 пробы сывороток крови, собранных в г. Курске и 20 сельских районах области, оказались отрицательными. Среди доноров было 28 мужчин и 33 женщины в возрасте от 19 до 50 и более лет.

### **Липецкая область**

Из Липецкой области были обследованы 614 сыворотки, собранные в г. Липецке (210 проб) и четырех районах: Данковском (117), Добровском (107), Елецком (80) и Липецком (100). IgG и нейтрализующие антитела к вирусу ЗН обнаружены у 2 из 210 жителей Липецка (0,95%) и 1 из 117 жителей Данковского района (0,9%). Титры IgG антител в трех позитивных сыворотках составили 1:400, 1:400, 1:1600, титры нейтрализующих антител – 1:20. Титры IgG во всех случаях превышали титры нейтрализующих антител ( $P<0,0001$ ). В среднем по области антитела выявлены у 0,5% населения: у женщин (n=319) в 0,3% случаев, у мужчин (n=295) в 0,7%; в возрастных группах от 20 до 49 лет (n=227) в 0,9%, от 49 лет и старше (n=356) в 0,3% ( $p>0,05$ ). Результаты обследования лиц в возрасте до 19 лет (n=31) оказались отрицательными.

### **Тамбовская область**

При обследовании 1023 сывороток крови из Тамбовской области IgG антитела к вирусу ЗН были обнаружены в семи пробах (0,7%), 4 (0,4%) из которых оказались положительными и в РН. Титры IgG превышали титры нейтрализующих антител ( $P<0,0001$ ).

Большинство сывороток (656) были получены из Тамбова, Тамбовского района, а так же 23 других территорий области. Адреса 367 доноров не были установлены. Положительные находки выявлены (в сумме) у шести жителей Жердевского, Мордовского, Моршанского, Петровского, Уваровского районов и одного донора с неизвестным местом жительства.

В среднем по области антитела были обнаружены у 0,7% населения: у женщин (n=691) в 0,9%, у мужчин (n=332) в 0,3% ( $p>0,05$ ); в возрастных группах от 20 до 29 лет (n=107) в 0,9%, от 30 до 49 лет (n=252) в 0,4%, от 50 лет и старше (n=500) в 0,6% ( $p>0,05$ ). Результаты обследования лиц в возрасте до 19 лет (n=42) оказались отрицательными. Среди сывороток 122 доноров, чей возраст установить не удалось, выявлено две серопозитивные пробы (1,6%).

В целом в результате обследования 1826 сывороток крови населения, проживающего на территориях лесостепной зоны (Воронежская, Курская, Липецкая и Тамбовская области) антитела к вирусу ЗН были обнаружены в 12 пробах (0,7%): в 11-и в ИФА-IgG и в 9 из них в РН. Результаты двух тестов совпали в 81,9%. Частота обнаружения антител у лиц мужского (n=683) и женского (n=1101) пола составила соответственно 0,4% и 0,7% ( $p>0,05$ ); в возрастных группах до 19 лет (n=79), 20-29 (n=244), 30-49 (n=570), 50 и более лет (n=530) – 0; 1,3; 0,5; 0,75% соответственно ( $p>0,05$ ).

### **Тульская область**

Методами ИФА-IgG и РН было обследовано 400 сывороток крови жителей Тульской области: 100 проб из г. Новомосковск, 98 из г. Тулы, 91 из Чернского района, 77 из Плавского района, 34 из других районов. В шести пробах (1,5%) были обнаружены как IgG, так и нейтрализующие антитела к вирусу ЗН. Частота положительных находок в среднем по области составила 1,5%, среди жителей Тулы, Чернского района и г. Новомосковск соответственно 3,1; 2,2; и 1,3%. В возрастных группах населения до 19 лет (n=22), от 20 до 39 лет (n=114), от 40 до 49 лет (n=56) от 50 лет и старше (n=193) показатели обнаружения антител составили соответственно 0; 2,6; 1,8 и 1,0% (p>0,05); у женщин (n=227) и мужчин (n=132) 1,8 и 0,8 % (p>0,05). Титры IgG антител оказались значительно выше, чем нейтрализующих (p<0,05).

### **Калужская область**

Методами ИФА-IgG и РН с отрицательными результатами были обследованы 52 сыворотки крови доноров в возрасте от 19 до 50 лет и старше, проживающих в г. Калуге (18 проб), Козельском районе (9) и 12 других районах области (25 проб). Среди обследованных было 27 мужчин и 25 женщин.

### **Москва**

В результате обследования 424 сывороток крови жителей Москва (154 детей в возрасте от 4 до 14 лет, 270 взрослых мужчин и женщин. IgG и нейтрализующие антитела к вирусу ЗН, в титрах соответственно 1:400 и 1:80, были выявлены у одного ребенка (0,2%).

### **Московская область**

Из Московской области были обследованы 140 сывороток крови доноров (в возрасте от 20 до 60 лет), проживающих на территориях южных, северных, западных и восточных районов. В одной пробе (0,7%) обнаружены IgG антитела к вирусу ЗН (в титре 1:400) при отсутствии нейтрализующих. Возможно, наличие антител у двух жителей Москвы и Московской области связано с предшествующим посещением регионов, эндемичных по ЛЗН.

### **Рязанская область**

Результаты обследования 124 сывороток крови, полученных из Касимовского (27 проб), Клепиковского (22), Скопинского (17), Спасского (43) районов и Рязани (12) оказались отрицательными. IgG к вирусу ЗН (в титрах 1:200, 1:200 и 1:400) и нейтрализующие антитела (в титре 1:20) были обнаружены только у трех из 25 сезонных сельскохозяйственных рабочих – граждан Таджикистана и Молдавии (территорий, эндемичных по ЛЗН).

### **Тверская область**

По данным обследования в ИФА-IgG и РН антитела к вирусу ЗН отсутствовали у 97 – жителей Вышне-Волочёцкого района: 79 женщин и 18 мужчин в возрасте 30-50 лет.

## Северо-Западный федеральный округ

### Вологодская область

Область является гиперэндемичной по клещевому энцефалиту, поэтому 203 сыворотки крови доноров-жителей г. Вологды и Вологодского района были обследованы методом ИФА-IgG параллельно на антитела к вирусам клещевого энцефалита и лихорадки ЗН.

С антигеном вируса клещевого энцефалита положительно реагировали 7 сывороток (3,4%), из них 5 (2,5%) – с антигеном вируса ЗН. Титры антител в тест-системе ИФА-IgG-КЭ значительно превышали титры гетерологичных антител, выявляемых в наборе ИФА-IgG-ЗН. Результаты обследования тех же проб в РН с вирусом ЗН оказались отрицательными (Таблица 3). Таким образом, серопозитивные пробы содержали специфические антитела к вирусу КЭ, но не к вирусу ЗН.

В 2010-2014 гг. методами ИФА-IgG и РН была обследована 6341 проба сывороток крови доноров, проживающих на территориях пяти Федеральных округов России. Антитела к вирусу ЗН обнаружены у жителей Астраханской области (в 19,6%), Краснодарского края (4,5%), Ставропольского края (4,5%), Саратовской (0,9%), Воронежской (1,6%), Тульской (1,5%), Тамбовской (0,7%) и Липецкой (0,6%) областей. Две серопозитивные пробы выявлены у жителей Москвы и Московской области, инфицированных, возможно, во время пребывания в регионах, эндемичных по лихорадке ЗН. Результаты тестирования сывороток местных жителей Калужской, Рязанской, Тверской, Вологодской, Ульяновской областей и Республики Татарстан оказались отрицательными.

**Таблица 3 – Результаты обследования позитивных сывороток крови жителей Вологодской области методом ИФА-IgG с антигенами вирусов КЭ и ЗН**

№№ сывороток	Титры антител с антигенами вирусов	
	КЭ	ЗН
43	1:800	1:100
60	1:100	0*
84	1:800	1:200
109	1:400	0
156	1:200	1:100
158	1:1600	1:400
172	1:3200	1:100

Примечание: \*отрицательный результат в разведении 1:100

Таким образом, совпадение результатов обследования сывороток в ИФА-IgG и РН составило 100% по Вологодской, Калужской, Курской, Липецкой областям, г. Москве, Республике Татарстан, Рязанской, Тверской, Тульской и Ульяновской областям; по Астраханской области – 80,7%, по Краснодарскому краю – 72,7%, по Саратовской, Тамбовской и Воронежской областям, соответственно 69,2; 57,1 и 50% (в среднем по всем обследованным сывороткам – 75,5%) (Таблица 4). Данные сероэпидемиологического исследования свидетельствуют об активности очагов в Южном и Северо-Кавказском, Приволжском и Центральном округе (Таблица 5). Северная граница ареала вируса ЗН находится на территории Тульской области в пределах географических координат: на севере - 54°50' с.ш., 37°25' в.д.; на юге - 52°57' с.ш., 38°19' в.д.; на западе - 53°50' с. ш., 35°54' в. д.; на востоке - 53°43' с. ш., 38°56' в.д.



**Таблица 4 – Общие результаты обследования сывороток крови населения Европейской части России на антитела к вирусу ЗН**

Территории	Число обследованных сывороток	Число и % положительных	3 (0,5)	3 (0,5)	0 (100)
Москва	424	в РН	в ИФА IgG	Всего в РН и ИФА	Совпадение результатов в РН и ИФА IgG (%%)
Астраханская область	657	88 (13,2)	129(19,6)	109 (16,6)	88 (80,7%)
Вологодская область	203	0	0	0	0 (100)
Воронежская область	128	2 (1,6)	1 (0,8)	2 (1,6)	1 (50)
Калужская область	52	0	0	0	0 (100)
Краснодарский край	243	9 (3,7)	11 (4,5)	11 (4,5)	8 (72,7)
Курская область	61	0	0	0	0 (100)
Саратовская область	1448	9 (0,6)	13 (0,8)	13 (0,8)	9 (69,2)
Тульская область	400	6 (1,5)	6 (1,5)	6 (1,5)	6 (100)
Ульяновская область	471	0	0	0	0 (100)
<b>ВСЕГО</b>	<b>6341</b>	<b>126 (1,98)</b>	<b>177 (2,8)</b>	<b>159 (2,5)</b>	<b>120(75,5)</b>

Примечание: \* Эти три положительные сыворотки крови (из 124 обследованных) были взяты у сезонных рабочих из стран, эндемичных по ЛЗН.

**Таблица 5 - Распределение находок антител к вирусу ЗН у населения, проживающего на территориях различных ландшафтных зон Европейской части РФ (по суммарным данным обследования в ИФА-IgG и РН)**

Ландшафтные зоны	Площадь (тыс. кв. км)	Население (тыс. чел)	Число сывороток		% положительных и доверительные интервалы [ДИ 95%]
			обследованных	положительных	
<b>Степная, полупустынная, лесо-луговая и субтропическая</b> <i>Ставропольский край</i> <i>Краснодарский край</i>	142,5	7620	<b>299</b>	<b>14</b>	<b>4,7 [2,6; 7,7]</b>
<b>Полупустынная и пустынная</b> <i>Астраханская область</i>	44,1	1022,3	<b>657</b>	<b>129</b>	<b>19,6 [16,7; 22,9]</b>
<b>Лесостепная и степная</b> <i>Саратовская область</i>	100,2	2737,5	<b>1448</b>	<b>13</b>	<b>0,9 [0,5; 1,5]</b>
<b>Лесостепная</b> <i>Воронежская, Курская, Липецкая, Тамбовская области</i>	140,6	6405,3	<b>1826</b>	<b>12</b>	<b>0,7 [0,3; 1,2]</b>
<b>Лесостепная зона и зона лиственных лесов</b> <i>Ульяновская область</i>	37,3	1490	<b>471</b>	<b>0</b>	<b>0 [0; 0,8]</b>
<b>Зона лиственных лесов</b> <i>Тульская область</i>	25,7	1808,9	<b>400</b>	<b>6</b>	<b>1,5 [0,6; 3,2]</b>
<b>Зона южно-таёжных и лиственных лесов</b> <i>Москва, Московская, Тверская, Калужская, Рязанская области, Татарстан</i>	271,2	26576,5	<b>1037</b>	<b>2</b>	<b>0,2 [0,02;0,7]</b>
<b>Зона средне-таежных и южно-таёжных лесов</b> <i>Вологодская область</i>	145,7	1345,0	<b>203</b>	<b>0</b>	<b>0 [0;1,8]</b>
<b>Всего</b>	<b>907,3</b>	<b>4900,5</b>	<b>6341</b>	<b>176</b>	<b>2,8 [2,4; 3,2]</b>

### Случаи лихорадки Западного Нила в Тульской области

К началу выполнения диссертационной работы отсутствовали сведения о циркуляции вируса ЗН и случаях заболевания ЛЗН на этой территории, хотя в пограничной Липецкой области и близлежащей Воронежской области являются эндемичными по этой инфекции, где первые больные ЛЗН были зарегистрированы соответственно в 2012 и 2010 гг.

В 2013 году было обследовано 143 сыворотки крови от 132 больных острыми лихорадочными заболеваниями, госпитализированных в лечебные учреждения Тулы летом 2012 года с целью проведения серодиагностики ГЛПС.

В результате обследования методами ИФА-IgM, ИФА-IgG и РН 143-х сывороток крови 132 больных антитела к вирусу ЗН были обнаружены у 7 пациентов.

В сыворотке крови, взятой у больной К.Г.В. на 11 день болезни были обнаружены IgM, IgG и нейтрализующие антитела к вирусу ЗН в титрах соответственно 1:3200, 1:3200 и 1:20, у больного О.С.С. на 14 день болезни в титрах 1:12800 (IgM), 1:1600 (IgG) и 1:40 (нейтрализующие). У больного П.А.В. на 10 и 16 дни после начала болезни в равных титрах (1:6400) выявлялись специфические IgM, нейтрализующие антитела (1:40) и сероконверсия IgM (от 1:800 до 1:3200). От больной А.Н.И. были получены 3 пробы сыворотки: через 16, 23 и 317 дней после начала болезни. Титры IgM в I, II и III пробах составляли соответственно 1:3200, 1:3200 и < 1:50, IgG – 1:3200, 1:3200, 1:3200; в РН  $\leq$ 1:20,  $\leq$ 1:20 (сомнительный результат при разведении 1:20) и 1:320.

Подобная картина динамики IgM, IgG и нейтрализующих антител является типичной для лихорадки ЗН, а полученные данные указывают на этиологическое значение вируса ЗН в этих случаях. В сыворотках крови трех пациентов (М.В.С., К.И.В. и О.Ю.В.) при отсутствии IgM к вирусу ЗН были обнаружены специфические IgG и нейтрализующие антитела. Результаты обследования всех проб на IgG к вирусу клещевого энцефалита оказались отрицательными (Таблица 6).

**Таблица 6 - Результаты обследования в ИФА-IgM, ИФА-IgG и РН сывороток крови больных с подозрением на ГЛПС из Тульской области (июнь-сентябрь 2012г.) на антитела к вирусу ЗН**

Больные	Дата заболевания	Дни от начала болезни	Антитела к вирусу ЗН			IgG к вирусу КЭ
			IgM	IgG	РН	
М. С. В.	02.07.12	-	отр	1:800	1:20	отр
К. И. В.	-	-	отр отр	1:3200 1:3200	1:320 1:320	отр отр
К. Г. В.	03.08.12	11	1:3200	1:3200	1:20	отр
О. С. С.	03.08.12	14	1:12800	1:1600	1:40	отр
П. А. В.	18.08.12	13 17	1:6400 1:6400	1:800 1:3200	1:40 1:40	отр отр
А. Н. И.	18.08.12	11 18 317	1:3200 1:3200 отр	1:3200 1:3200 1:3200	1:20?* 1:20?* 1:320	отр отр отр
О. Ю. В.	-	-	отр	1:400	1:20	отр

Примечание: \* 1:20? - сомнительный результат (+/-)

Таким образом, в Туле и Тульской области впервые верифицированы 4 случая ЛЗН, что указывает на расширение ареала ЛЗН. Наличие анамнестических IgG и нейтрализующих антител к вирусу ЗН (при отсутствии IgM) у трех больных подтверждают факт циркуляции вируса ЗН на территории области и свидетельствуют об инфицировании этих пациентов в предыдущие годы.

### **Обследование реконвалесцентов, перенесших лихорадку Западного Нила, на специфические IgM, IgG и нейтрализующие антитела.**

Диагностика большинства арбовирусных инфекций, включая ЛЗН, основана на результатах вирусологического, молекулярно-генетического и серологического обследования больных. В случае ЛЗН по причине короткого периода вирусемии методы выделения вируса, а также обнаружения вирусной РНК в крови или ликворе обладают ограниченной эффективностью. Основное диагностическое значение имеет метод иммуноферментного анализа, позволяющий выявлять специфические антитела IgM, которые появляются в крови, как правило, на 2-5-й день болезни и достигают очень высокого максимального уровня через 1,5-2 недели. Опыт многолетнего использования метода ИФА-IgM в научных и практических лабораториях России лег в основу ряда методических указаний и рекомендаций, основанных на применении, главным образом, сертифицированных наборов производства ЗАО «Биосервис» (Москва) и ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Важным критерием для дифференциации острой инфекции ЗН от предшествующей - перенесенной в предыдущий год или ранее, является продолжительность персистенции специфических IgM антител у реконвалесцентов, перенесших это заболевание. Обнаружение у пациентов IgM антител к вирусу ЗН обычно рассматривается как свидетельство недавно приобретенного заболевания ЛЗН.

Данные отечественных и иностранных авторов по вопросу персистенции IgM антител у реконвалесцентов, перенесших ЛЗН разноречивы, поэтому с участием трех лабораторий было проведено обследование 29 сывороток крови 26 больных, обследованных на 3-18 дни заболевания, и реконвалесцентов с серологически подтвержденным диагнозом ЛЗН через 243-358 дней от начала болезни. Обследование сывороток больных и реконвалесцентов в вирусологической лаборатории ЦГиЭ (Астрахань) и НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского было выполнено с использованием ИФА-IgM и ИФА-IgG тест-систем «Биоскрин» (ЗАО «Биосервис», Москва) и экспериментальных наборов НИИ вирусологии. В Волгоградском ПЧИ применяли тест-системы ИФА-IgM «Биоскрин» и ИФА-IgG «Euroimmun» (Германия). Кроме того, сыворотки реконвалесцентов были обследованы нами в реакции нейтрализации.

Среди 19 сывороток крови, взятых у больных лихорадкой ЗН в период с 3 по 8 дни от начала заболевания, специфические IgM были обнаружены в 17 случаях (94,4%), в период с 9 по 18 дни во всех 11 обследованных пробах (100%) (Таблица 7).

Титры IgM варьировали от 1:1600 до 51200. Средние геометрические титров IgM составляли 1:7233 с 3 по 8 день после начала болезни, 1:9341 с 9 по 18 день болезни, 1:7997 с 3 по 18 день болезни.

IgG антитела к вирусу ЗН в сыворотках крови, взятых с 1 по 8 (n=16) с 9 по 18 (n=11) дни болезни были выявлены соответственно в 4-х (25,0%) и 7-и (63,6%) пробах, в среднем в 40,7%. Титры IgG в положительных сыворотках находились в пределах от 1:200 до 1:3200. Средние

геометрические титров IgG составляли 1:673 с 3 по 8 дни после начала болезни, 1:800 с 9 по 18, 1:751 с 3 по 18 дни болезни.

В 2014 году при обследовании сывороток крови 26 реконвалесцентов, взятых через 243-358 дней после начала заболевания ЛЗН, специфические IgG антитела были обнаружены в 24 случаях (92,3%) в титрах от 1:200 до 1: 3200 (среднее геометрическое титров - 1:476). 22 сыворотки из числа 24-х, обследованных в реакции нейтрализации (91,7%), содержали нейтрализующие антитела с титрами от 1:40 до 1:320 (среднее геометрическое титров - 1:88).

Полученные данные подтверждают факт продолжительной персистенции специфических IgG и нейтрализующих антител к вирусу ЗН и свидетельствуют о пригодности методов ИФА-IgG и РН для проведения сероэпидемиологических исследований, а ИФА-IgM для подтверждения диагноза ЛЗН в ранний период заболевания.

**Таблица 7 - Результаты обследования сывороток крови больных ЛЗН и реконвалесцентов, перенесших лихорадку Западного Нила в Астраханской области**

Больные ЛЗН	Обследование в 2013 г				Обследование в 2014 г							
	День болезни	IgM Аст	IgM Мск	IgG	День от начала заболевания	IgM			IgG			РН
						Аст	Влг	Мск	Аст	Влг	Мск	Мск
1	4	3200	6400	отр	281	отр	отр	отр	+	+	1600	160
2	5	≥3200	25600	400	287	400	отр	400	+	+	400	80
3	11	1600	3200	800	243	отр	отр	отр	+	+	200	40
4	8	≥3200	≥3200	отр	265	отр	отр	отр	+	+	800	80-160
5	10	6400	12800	1600	299	отр	отр	отр	+	+	1600	160-320
6	4	3200	3200	отр	289	отр	отр	отр	+	+	≥400	40-80
	9	+	6400	1600								
7	11	≥3200	12800	отр	289	отр	±	отр	+	+	3200	320
8	4	≥3200	12800	отр	284	400	отр	400	+	+	400	80
9	11	≥3200	12800	800	281	отр	отр	отр	отр	отр	отр	отр
10	6	6400	25600	800	299	отр	отр	отр	+	отр	800	80-160
11	3	3200	6400	отр	277	отр	±	отр	+	отр	200	н/о
12	4	3200	12800	отр	262	отр	отр	отр	отр	отр	отр	н/о
	5	+	25600	отр								
13	5	6400	25600	отр	334	отр	отр	отр	+	+	200	80
14	5	1600	но	но	355	отр	отр	отр	+	+	800	160-320
15	7	1600	1600	отр	349	отр	отр	отр	+	+	200	40
16	4	1600	6400	отр	349	отр	отр	отр	+	+	400	80-160
17	18	6400	25600	отр	342	отр	отр	отр	+	+	800	320
18	8	1600	1600	3200	358	отр	отр	отр	+	+	≥400	80
19	10	≥3200	51200	отр	321	отр	отр	отр	+	+	800	40
20	17	≥800	25600	800	321	отр	отр	отр	+	+	≥400	40
21	7	1600	1600	отр	323	отр	отр	отр	+	+	≥400	отр
22	8	3200	6400	отр	319	отр	отр	отр	отр	отр	200	отр
23	9	3200	6400	800	328	отр	отр	отр	+	+	800	80
24	4	отр	отр	отр	306	отр	отр	отр	+	+	400	40
	11	1600	3200	отр								
25	5	≥3200	51200	200	322	отр	отр	отр	+	+	200	80
26	9	1600	800	200	338	отр	отр	отр	+	+	200	40

Примечание: У больных №1-5, 9, 10, 12 наблюдалась нейтроинвазивная форма ЛЗН, у остальных - лихорадочная форма. 3200 - обратная величина титра антител; отр - отрицательный; ± - сомнительный; + - положительный результат при разведении сыворотки 1:100; н/о - сыворотка не обследована; Аст - Астрахань; Влг - Волгоград; Мск - Москва.

Результаты обследования сывороток 24 (92.3%) из 26 реконвалесцентов на IgM антитела к вирусу ЗН оказались отрицательными. У реконвалесцентов №2 и 8, по данным лабораторий

Астрахани и Москвы, наблюдались низкие титры IgM (1:400) при незначительных показателях оптической плотности сывороток (0,3-0,4) и отрицательных результатах обследования в Волгоградском ПЧИ. Сыворотки реконвалесцентов № 5 и 7 оказались слабоположительными или сомнительными при постановке в Волгоградском ПЧИ и отрицательными при обследовании в НИИ вирусологии. Специфические IgG антитела были обнаружены у 24 (92,3%) из 26 реконвалесцентов, вируснейтрализующие - у 22 (91,7%) из 24.

Расхождение данных разных авторов о длительности персистенции специфических IgM у реконвалесцентов, перенесших ЛЗН, можно объяснить несколькими причинами:

- 1) использование неравнозначных по характеристиками ИФА-IgM тест-систем разных производителей;
- 2) отсутствием в большинстве из них контроля «положительных» сывороток с нормальным антигеном (что может привести к учету ложноположительных результатов);
- 3) возможным занижением фирмами-производителями тест-систем пороговых уровней оптических плотностей, являющихся основой дифференциации положительных, сомнительных и отрицательных результатов обследования;
- 4) различиями в продолжительности сезона заболеваемости ЛЗН на территориях эндемичных стран с разными климатическими условиями определяющими возможность повторного инфицирования в течение одного года;
- 5) различиями в числе обследованных больных ЛЗН с разными клиническими формами заболевания (нейроинфекционная, лихорадочная, инаппаратная);
- 6) возможность перекрестных реакций вируса ЛЗН с сыворотками, содержащими антитела к гетерологичным флавивирусам.

#### **Вирусологическое обследование клинических материалов от больных острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии**

В процессе выполнения данного раздела работы методом заражения нбм, а в некоторых случаях культуры клеток Vero E6 с последующей инокуляцией нбм пробами культуральной жидкости инфицированных культур в 2012-2018 годах, были использованы следующие материалы: сыворотки крови больных с подохрением на арбовирусные инфекции, полученные из вирусологической лаборатории Астраханского ЦГиЭ и Астраханской областной инфекционной больницы им. А. М. Ничоги, пробы крови, слюны и мочи, полученные в 2010-2017 гг. из ИКБ №1 г. Москвы от лиц, госпитализированных после возвращения из поездок в тропические страны, эндемичные по ЛЗН и другим этиологически и клинически сходным арбовирусным заболеваниям.

Всего было обследовано 243 клинические пробы от 235 больных: 176 сывороток крови из Астраханской области, 24 пробы крови от лиц, возвратившихся из Таиланда, 11 проб крови из Индонезии, 4 пробы крови из Вьетнама, 2 пробы крови из Мальдивской республики, по одной пробе крови из Малайзии и Республики Филиппины, 1 проба крови и 1 проба мочи из Бангладеша, 8 проб крови, 4 пробы мочи, 2 пробы слюны из Доминиканской республики, 1 проба крови с Антильских островов, 2 пробы крови из Венесуэлы, 1 проба крови из Республики Гайяна, 2 пробы крови и 1 проба мочи из Мексики и 1 проба крови из Республики Фиджи.

В результате проведенной работы было выделено 27 штаммов арбовирусов (11,1% от числа обследованных проб), в том числе 6 штаммов вируса ККГЛ (генотип Европа 1) и 1 штамм вируса ЗН (генотип 1a) от больных-жителей Астраханской области, 8 штаммов вируса денге 1, 8 штаммов вируса денге 2, 1 штамм вируса денге 3, 2 штамма вирус Зика (азиатского генотипа), 1 штамм вируса Чикунгунья (азиатского генотипа) от больных, побывавших в тропических странах, где наряду с эпидемиями и эпидемическими вспышками лихорадок денге, Зика и Чикунгунья регистрируются спорадические случаи ЛЗН. Отрицательные попытки выделения штаммов вируса ЗН, очевидно, свидетельствуют о низкой активности его циркуляции вируса ЗН в тропических регионах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность проблемы арбовирусных инфекций определяется их глобальным распространением, масштабами эпидемий и эпизоотий, тяжестью клинических проявлений, высокой летальностью, отсутствием этиотропных средств лечения, ограниченным ассортиментом имеющихся вакцин и диагностических тест-систем, открытием новых патогенных агентов и ассоциированных с ними неизвестными нозологическими формами заболеваний. Особое внимание в настоящее время привлекает процесс распространения многих арбовирусов на неэндемичные территории мира в результате их интродукции из эндемичных регионов.

Ареал вируса ЗН, по сравнению с прочими арбовирусами, не имеет аналогов и охватывает Африку, эндемичные регионы Европы, Центральную, Южную, Ю.-В. Азию, Ближний Восток, Океанию, Австралию, большую часть территории США, южные провинции Канады, Центральную и Южную Америку. При различных эпидемических вспышках и эпидемиях показатели летальности при ЛЗН варьировали от 4 до 14%.

Вирус ЗН впервые в СССР был выделен из преимаго клещей *Hyalomma marginatum*, собранных в 1963 г. в Астраханской области. В 1967 г. в результате вирусологического и серологического обследования больных острыми лихорадочными заболеваниями было верифицировано 11 случаев ЛЗН. В 1999 г. первая эпидемическая вспышка ЛЗН наблюдались в южном регионе Европейской части России, где было зарегистрировано 560 лабораторно подтвержденных случаев. Следующая значительная вспышка в РФ наблюдалась в 2010 году.

В 2000 г. случаи ЛЗН были выявлены в Ростовской области, затем в Воронежской и Саратовской, в 2012 г. Липецкой, Самарской и Белгородской и Тульской областях.

Актуальное значение приобрели исследования, направленные на мониторинг активности циркуляции вируса ЗН в эндемичных регионах страны и сопредельных территориях с целью определения современного ареала этой инфекции.

При выполнении диссертации предусматривалась необходимость решения ряда методологических аспектов, важных для интерпретации результатов серологических исследований. Первый связан с наличием перекрестных антигенных связей, выявляемых между родственными флавивирусами. По этой причине, сыворотки жителей регионов, эндемичных по клещевому энцефалиту (в случае положительных результатов ИФА-IgG с антигеном вируса ЗН)

были обследованы параллельно методом ИФА-IgG с антигенами вирусов ЗН и клещевого энцефалита, а также в реакции нейтрализации для определения специфичности антител.

Второй аспект заключался в необходимости изучения персистенции специфических IgM, IgG и нейтрализующих антител у больных ЛЗН и реконвалесцентов, перенесших это заболевание, с целью определения пригодности этих методов ИФА для выявления ранних и анамнестических антител к вирусу ЗН.

Впервые с применением трех альтернативных методов (ИФА-IgG, ИФА-IgM и реакции нейтрализации) проведены широкие (включающие 6341 сывороток крови доноров) серологические исследования, направленные на изучение циркуляции вируса ЗН в Европейской части России общей площадью 907,3 км<sup>2</sup> с населением более 49 млн. человек. Полученные данные в сочетании со статистикой заболеваемости свидетельствуют об активности очагов лихорадки ЗН в Южном, Северо-Кавказском, Приволжском (Саратовская область), Центральном округах ((лесостепная зона) и Тульская область (зона лиственных лесов). Результаты обследования сывороток доноров из Калужской, Рязанской, Тверской, Вологодской областей и Татарстана, оказались отрицательными. Установлено, что современная северная граница ареала вируса Западного Нила находится, на широте Тульской области, где впервые в результате серологического обследования 132 больных острыми сезонными лихорадочными заболеваниями впервые были верифицированы 4 случая ЛЗН.

Подтвержден факт отсутствия специфических IgM антител у реконвалесцентов, обследованных через 243-358 дней после начала заболевания ЛЗН, при сохранении IgG антител в 88,5% случаев и нейтрализующих антител в 91,7%. Эти данные подтверждают адекватность принятых в РФ критериев и тактики серологической диагностики ЛЗН, основанной на применении метода ИФА-IgM и целесообразность параллельного применения методов ИФА-IgG и реакции нейтрализации для проведения сероэпидемиологических исследований.

Представлялось целесообразным проведение вирусологического обследования клинических материалов, собранных от больных лихорадочными заболеваниями неясной этиологии в Астраханской области и пациентов, возвратившихся в Москву из эндемичных по ЛЗН регионов мира для получения дополнительной информации об ареале вируса ЗН, выявления эпидемиологической активности других арбовирусных агентов, идентификации и филогенетического анализа выделенных штаммов.

В результате обследования клинических материалов, собранных от лихорадящих больных в Астраханской области и пациентов, возвратившихся в Москву из тропических стран, эндемичных по ЛЗН, был выделен и идентифицирован один штамм вируса ЗН, 6 штаммов вируса ККГЛ, 17 штаммов вируса денге, 2 штамма вируса Зика и один штамм вируса Чикунгунья. Отрицательные результаты выделения вируса ЗН от больных, заразившихся в тропических странах, свидетельствуют о низкой активности его циркуляции в этих регионах.

Данные по идентификации штаммов вирусов денге, выделенных от больных инфицированных в странах Ю.-В. Азии, указывают на доминирующую циркуляцию вирусов денге 1 и 2, что совпадает с результатами зарубежных исследований. Выделение шести штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа 1 и штамма вируса Западного Нила генотипа 1а подтверждают факт стабильности генетических популяций этих вирусов в Астраханской области на протяжении пятидесяти с лишним лет.

## ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенных сероэпидемиологических исследований свидетельствуют об активности очагов ЛЗН в Южном федеральном округе (Краснодарский край и Астраханская область), Приволжском округе (Саратовская область) и Центральном округе (лесостепная зона) и Тульская область (зона лиственных лесов), что коррелирует с данными о заболеваемости ЛЗН и указывают на расширение очагов этой инфекции на территории Европейской части России. Наиболее активные и стабильные очаги ЛЗН расположены в Астраханской, Волгоградской, Ростовской областях и Краснодарском крае.

2. С использованием методов ИФА-IgM, ИФА-IgG и реакции нейтрализации 4 случая ЛЗН были впервые верифицированы в Тульской области, где установлена современная северная граница ареала этой инфекции в Европейской части РФ. Не получено доказательств циркуляции вируса ЗН в Калужской, Рязанской, Московской, Тверской, Вологодской, Ульяновской областях и Республике Татарстан.

3. Учитывая наличие перекрестных антигенных связей между вирусами ЗН и клещевого энцефалита, выявляемых методом ИФА-IgG, сыворотки жителей регионов, эндемичных по клещевому энцефалиту, необходимо параллельно обследовать на антитела к этим вирусам как в ИФА-IgG, так и в реакции нейтрализации с целью корректной интерпретации результатов.

4. Специфические IgM антитела, присутствующие в сыворотках крови у всех обследованных больных ЛЗН на 3-18 дни заболевания, не обнаруживаются в период поздней реконвалесценции при сохранении IgG и нейтрализующих антител, что подтверждает пригодность метода ИФА-IgM для экспресс-диагностики ЛЗН в ранний период болезни, а ИФА-IgG и реакции нейтрализации для проведения сероэпидемиологических исследований.

5. В результате вирусологического обследования клинических материалов от больных острыми лихорадочными заболеваниями с целью получения дополнительной информации о распространении вируса ЗН был выделен 1 штамм вируса ЗН генотипа 1a, 6 штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа 1 (Астраханская область), 17 штаммов вирусов денге, 1 штамм вируса Чикунгунья, 2 штамма вируса Зика от пациентов, возвратившихся в Москву после посещения тропических стран, где регистрируются спорадические случаи ЛЗН. Эти данные подтверждают сведения о низкой активности циркуляции вируса ЗН в тропических регионах Ю. Америки и Ю.-В. Азии. Результаты идентификации штаммов вирусов денге указывают на доминирующую циркуляцию вирусов денге 1 и 2 в странах Ю.-В. Азии. Выделение штаммов вирусов ККГЛ генотипа Европа 1 и ЗН генотипа 1a свидетельствуют о стабильности генетических популяций этих вирусов в Астраханской области на протяжении пятидесяти с лишним лет.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Азарян А.Р., Козлова А.А., Гришанова А.П., Иващенко Е.И., Шендо Г.Л., Ковтунов А.И., Антонов В.А., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Снатенков Е.А., Баркова И.А., Ларичев В.Ф., Бутенко А.М. // Обследование реконвалесцентов, перенесших лихорадку Западного Нила, на специфические IgM, IgG и нейтрализующие антитела / Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2016. - Т. 21, № 2. - С. 82-86.



2. Бутенко А.М., **Козлова А.А.**, Ларичев В.Ф., Дзагурова Т.К., Пантюхова Р.А., Важненко Н.С., Карлова В.М., Василькова О.И. Лихорадка Западного Нила в Тульской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №2. – С.20-25.
3. **Козлова А. А.**, Бутенко А. М., Ларичев В. Ф., Азарян А. Р., Гришанова А. П., Иващенко Е. И., Шендо Г. Л., Дзагурова Т. К., Пиликова О. М., Василенко Н. Ф. Изучение ареала вируса Западного Нила на территории Европейской части России. Результаты сероэпидемиологических исследований. Сообщение 1: Астраханская область, Краснодарский край, Ставропольский край, Саратовская область. // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2016. - Т. 21, №5. - С. 244-252.
4. **Козлова А.А.**, Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Вашкова В.В., Дзагурова Т.К., Елисеева С.М., Зорина Д.М., Корабельникова М.И., Кудрявцева Е.Н., Лебедева С.Д., Лесникова М.В., Недия Н.В., Соколова М.В. Изучение ареала вируса Западного Нила на территории Европейской части России. Результаты сероэпидемиологических исследований. Сообщение 2: Центральный, Приволжский и Северо-Западный Федеральные округа. Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2017. - № 22(1). - С. 52-57.
5. **Козлова А. А.**, Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Вашкова В.В., Сайфуллин М.А., Азарян А. Р., Гришанова А.П., Иващенко Е. И., Гущин В.А., Щетинин А.М., Никифорова М. А., Климентов А. С., Прилипов А. Г., Альховский С. В. Результаты вирусологического обследования клинических материалов от больных острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018. - №23 (6). - С. 286-293.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Вирус ЗН – вирус Западного Нила  
 ДИ - доверительный интервал  
 ИАЖ - иммунная асцитная жидкость  
 ИКБ №1 - Инфекционная клиническая больница №1  
 ИФА (ELISA) - иммуно-ферментный анализ  
 ИФА-IgM - иммуноферментный метод захвата IgM антител  
 МФА-IgG - иммуноферментный метод захвата IgG антител  
 К+ - положительный контроль  
 К- - отрицательный контроль  
 ККГЛ - Крымская-Конго геморрагическая лихорадка.  
 КЭ - клещевой энцефалит  
 ЛЗН - лихорадка Западного Нила  
 нбм - новорожденная белая мышь  
 ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией  
 ПЦР - полимеразная цепная реакция  
 ПЧС - противочумная станция  
 ПЧИ - противочумный институт

РМАЛ - реакция микроагглютинации

РН - реакция нейтрализации

РНК - рибонуклеиновая кислота

СМЖ - спинно-мозговая жидкость

ЦГиЭ - Центр гигиены и эпидемиологии

ЦНС - центральная нервная система

IgG - иммуноглобулины класса G

IgM - иммуноглобулины класса M