

<https://doi.org/10.17116/molgen201937031140>

## Выявление маркеров лихорадки денге у пациентов после посещения эндемичных по денге стран

© В.А. ТЕРНОВОЙ, И.В. ПЛЯСУНОВА, А.О. СЕМЕНЦОВА, М.Ю. КАРТАШОВ, А.Н. ШВАЛОВ, Е.В. ЧАУСОВ, Л.И. ЕРЕМЕЕВА, Е.В. ПРОТОПОПОВА, Е.В. ЧУБ, Р.Б. БАЯНДИН, О.В. ПЬЯНКОВ, В.Б. ЛОКТЕВ, А.П. АГАФОНОВ, Р.А. МАКСЮТОВ

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

### Резюме

В исследованных образцах сыворотки крови от российских пациентов, госпитализированных с подозрением на лихорадку денге, были обнаружены один или несколько маркеров лихорадки денге — вирусная РНК, NS1 антиген, IgM или IgG антитела. Причем только совместное использование различных иммунологических и генетических методов обеспечивало более эффективную диагностику лихорадки денге. Документировано выявление IgG к вирусу денге у пациентов с высокими титрами IgG к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) и, напротив, — выявление IgG к вирусу ВКЭ у пациентов с высокими титрами IgG к денге. Полученные результаты подтверждают данные литературы о выраженных антигенных перекрестах между различными представителями флавивирусов, что может затруднить проведение ИФА-диагностики ВКЭ и денге у пациентов. Генотипирование выделенных изолятов вируса денге показало, что завозные случаи лихорадки денге вызваны субтипами 1-4 вируса денге, с превалированием случаев инфекции, вызванной вирусом денге 1. Секвенирование этих изолятов вируса денге, в том числе полногеномное, показало, что вирусные изоляты, выделенные на территории России, филогенетически близки к современным вариантам вируса денге, циркулирующим в странах Юго-Восточной Азии.

**Ключевые слова:** вирус денге, антитела, иммуноферментный анализ, вирус клещевого энцефалита.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Терновой В.А. — e-mail: [tern@vector.nsc.ru](mailto:tern@vector.nsc.ru); <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Плясунова И.В. — <https://orcid.org/0000-0001-6764-4466>

Семенцова А.О. — <https://orcid.org/0000-0002-7188-5948>

Карташов М.Ю. — <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Швалов А.Н. — <https://orcid.org/0000-0001-6890-1575>

Часов Е.В. — <https://orcid.org/0000-0002-1287-6427>

Еремеева Л.И. — <https://orcid.org/0000-0003-1675-1397>

Протопопова Е.В. — <https://orcid.org/0000-0002-1740-228X>

Чуб Е.В. — <https://orcid.org/0000-0003-1521-897X>

Баяндин Р.Б. — <https://orcid.org/0000-0002-6460-0828>

Пьянков О.В. — <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Локтев В.Б. — <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Агафонов А.П. — <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Максютов Р.А. — <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

### АВТОР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ПЕРЕПИСКУ:

Терновой В.А. — e-mail: [tern@vector.nsc.ru](mailto:tern@vector.nsc.ru)

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Терновой В.А., Плясунова И.В., Семенцова А.О., Карташов М.Ю., Швалов А.Н., Часов Е.В., Еремеева Л.И., Протопопова Е.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Пьянков О.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П., Максютот Р.А. Выявление маркеров лихорадки денге у пациентов после посещения эндемичных по денге стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019;37(3):140-148. <https://doi.org/10.17116/molgen201937031140>

## Identification of dengue infection markers in patients after visiting to dengue endemic countries

© V.A. TERNOVOI, I.V. PLYASUNOVA, A.O. SEMENTSOVA, M.YU. KARTASHOV, A.N. SHVALOV, E.V. CHAUSOV, L.I. EREMEEVA, E.V. PROTOPOPOVA, E.V. CHUB, R.B. BAYANDIN, O.V. P'YANKOV, V.B. LOKTEV, A.P. AGAFONOV, R.A. MAKSYUTOV

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rosпотребнадzor, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia, 630559

### Abstract

One or more markers of dengue infection such as viral RNA, NS1 antigen, IgM, or IgG antibody were detected in sera from Russian patients hospitalized with suspected dengue fever. The joint using of immunological and genetic methods is only provided a more effective diagnostics for dengue infection. The IgG against dengue virus has been detected in patients with high level IgG against tick-borne encephalitis virus (TBEV) and the contrary the IgG to TBEV has also been detected in patients with high titers of IgG to dengue virus. The obtained results are confirmed the antigenic cross-reactivity between different species of flaviviruses. These

may be inducing problems for using enzyme immunoassay for detection TBEV and dengue infection in patients. Genotyping of dengue virus isolates showed that imported to Russia cases of dengue infection are caused by subtypes 1–4 of the dengue virus with a prevalence of dengue 1 infection. Sequencing of these virus isolates showed that the isolates are phylogenetically similar to modern dengue virus variants from the countries of Southeast Asia.

**Keywords:** dengue virus, antibodies, enzyme immunoassay, tick-borne encephalitis virus.

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Ternovoi V.A. — e-mail: tern@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Plyasunova I.V. — <https://orcid.org/0000-0001-6764-4466>

Sementsova A.O. — <https://orcid.org/0000-0002-7188-5948>

Kartashov M.Yu. — <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Shvalov A.N. — <https://orcid.org/0000-0001-6890-1575>

Chausov E.V. — <https://orcid.org/0000-0002-1287-6427>

Eremeeva L.I. — <https://orcid.org/0000-0003-1675-1397>

Protopopova E.V. — <https://orcid.org/0000-0002-1740-228X>

Chub E.V. — <https://orcid.org/0000-0003-1521-897X>

Bayandin R.B. — <https://orcid.org/0000-0002-6460-0828>

P'yankov O.V. — <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Loktev V.B. — <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Agafonov A.P. — <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Maksyutov R.A. — <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

#### CORRESPONDING AUTHOR:

Ternovoi V.A. — e-mail: tern@vector.nsc.ru

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Ternovoi V.A., Plyasunova I.V., Sementsova A.O., Kartashov M.Yu., Shvalov A.N., Chausov E.V., Eremeeva L.I., Protopopova E.V., Chub E.V., Bayandin R.B., P'yankov O.V., Loktev V.B., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. Identification of dengue infection markers in patients after visiting to dengue endemic countries. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2019;37(3):140–148. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen201937031140>

## Введение

Лихорадка денге — зооантропонозное инфекционное заболевание с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, является эндемичным более чем для 100 стран Африки, Америки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана. По ориентировочным оценкам, ежегодно в мире регистрируется от 50 до 100 млн случаев лихорадки денге. При развитии геморрагического синдрома летальность может достигать 2,5%, а в случае отсутствия квалифицированной медицинской помощи при лихорадке денге летальность может превышать 20% [1].

Возбудитель лихорадки денге — это РНК-содержащий вирус, входящий в семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus*. Вирус денге наиболее часто передается человеку через укус комаров рода *Aedes* spp., причем в трансмиссию возбудителя вовлечены комары видов *A. aegypti*, *A. albopictus* и *A. koreicus*. Существует 4 субтипа вируса денге, причем пациенты могут последовательно заболеть лихорадкой денге несколько раз. Повторные случаи заболевания обычно связываются с различными субтипами вируса денге. Одна из особенностей иммунопатогенеза лихорадки денге связана с феноменом антителозависимого усиления инфекции [2]. Иммунные комплексы вирионов вируса денге с антителами инфицируют макрофагальные клетки через клеточные рецепторы к Fc фрагментам иммуноглобулинов. Вовлечение клеток макрофагального ряда в патогенез заболевания, по всей вероятности, способствует утяжелению течения повторных случаев заболевания, индуцирует развитие геморрагического синдрома и, возможно, препят-

ствует формированию полноценного иммунитета против лихорадки денге [2].

Широкое распространение лихорадки денге в странах с теплым климатом и рост числа российских граждан, посещающих эти страны, увеличивают риск появления завозных случаев заболевания лихорадкой денге на территории Российской Федерации [3–9]. Более того, комары *A. aegypti*, *A. albopictus* и *A. koreicus*, являющиеся основными векторами для вируса денге, встречаются в регионах России, примыкающих к Черному морю [10]. Наличие комаров-переносчиков может способствовать формированию локальных природных очагов лихорадки денге в южных регионах РФ.

Инкубационный период заболевания обычно составляет от 2 до 15 дней после укуса инфицированного комара, после чего развивается вирусная лихорадка, продолжающаяся 1–2 нед. Иногда она носит двухфазный характер и, как правило, заканчивается выздоровлением. Лабораторная диагностика основана на выявлении РНК вируса, антигена NS1 и специфических IgG и IgM антител. Вирусная РНК может быть обнаружена методом ОТ-ПЦР в слюстке крови, цельной крови, моче, а также в аутопсийном материале с момента появления клинических симптомов лихорадки и до 5–7-го дня заболевания [1]. Антиген NS1 вируса денге успешно детектируется в крови пациентов методом ИФА и методом иммунохроматографии (ИХ) в течение первых 10 дней с момента появления клинических признаков заболевания. Наличие РНК или NS1 антигена в сыворотке крови указывает на размножение вируса денге в организме пациента [2].

После 3–5 дней от начала заболевания лихорадкой денге начинают обнаруживаться специфические антитела, вы-

являемые методами ИФА и ИХ. Иммуноглобулины класса М в эти сроки выявляются у 50% пациентов, а к 10-му дню IgM антитела выявляются уже у большинства заболевших [1]. Максимальный титр IgM антител регистрируется через 2 нед после появления симптомов заболевания, и постепенное его снижение происходит в последующие 2—3 мес. Иммуноглобулины класса IgG обычно начинают обнаруживаться уже к концу 1-й недели заболевания, постепенно нарастая ко 2-й неделе и сохраняясь, как правило, в течение всей жизни. В случае повторного инфицирования пациента другим субтипом вируса денге титры антител нарастают быстрее, в основном за счет иммуноглобулинов класса G. Титр IgM во время повторной инфекции значительно ниже, чем при первичной инфекции [9].

В данной работе нами были использованы различные молекулярно-биологические и иммунологические методы для выявления маркеров лихорадки денге у пациентов после возвращения из эндемичных по лихорадке денге стран с целью оценки эффективности использования их для диагностики завозных случаев лихорадки денге в России.

### Материал и методы

В сыворотках крови пациентов с подозрением на лихорадку денге проводили выявление специфических к вирусу денге антител классов IgM и IgG и вирусного антиге-

на NS1. В работе были использованы иммунохроматографические методы с визуальной оценкой результатов (Dengue NS1Ag + AbCombosystem, «Standard Diagnostics, Inc», Корея) и иммуноферментные методы (ИФА) (ImmunoComb II DengueIgM/IgGBispot, «Orgenics Ltd.», Израиль и Dengue ELISA IgG/IgM, «Vircell Microbiologists», Испания). Выявление антител к вирусу клещевого энцефалита проводили с использованием наборов ВектоВКЭ-IgG и ВектоВКЭ-IgM (АО «Вектор-Бест», Россия), малярии «AgP.f/Pan, SDRapidTest» (Корея). Суммарную РНК выделяли при помощи набора QIAampViral RNA MiniExtractionKit («Qiagen», США). Выявление РНК вируса денге проводили с использованием коммерческих наборов Geno-Sen's DENGUE 1-4 RealTime PCR Kit («Genome Diagnostics Pvt. Ltd.», Индия) и Вектор-ПЦР-РВ-Денге-RG (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

Субтип вируса денге подтверждали секвенированием вирусной РНК (1-630 п.о.) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130xl («Hitachi»). Нуклеотидные последовательности исследованных изолятов вируса денге были депонированы в международной базе GenBank, (MG407228—MG407250). Филогенетический анализ осуществляли с использованием прикладных программ MEGA 7 (PSU) и DNASTAR Lasergene 9.

Участие пациентов в этом исследовании проводили в соответствии с их информированными согласиями, оформленными в медицинских учреждениях. При проведении

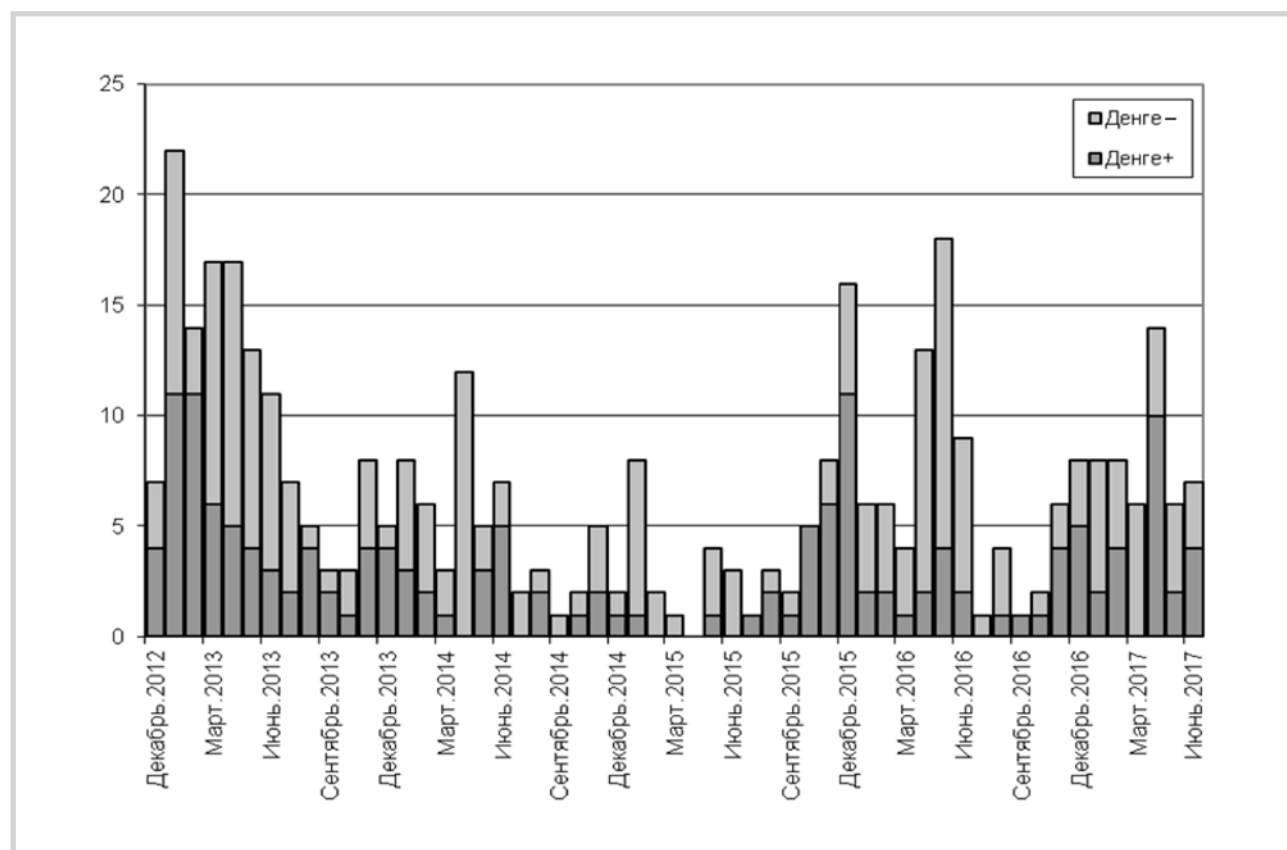
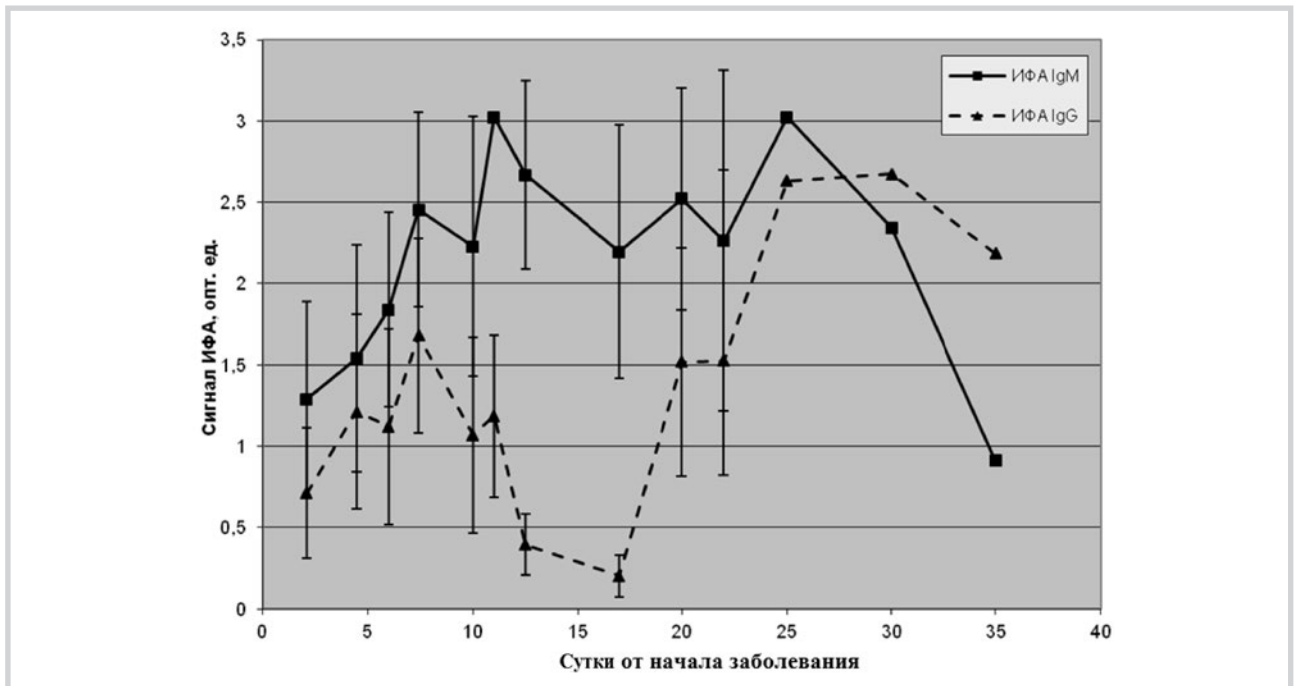


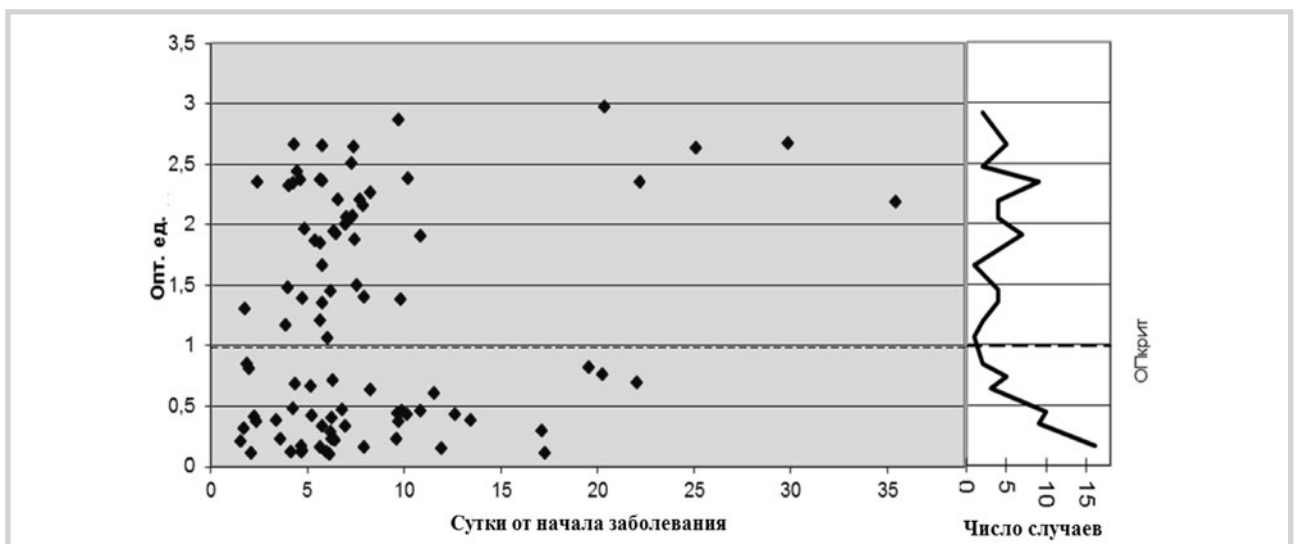
Рис. 1. Временные ряды распределения лабораторно подтвержденных и подозрительных случаев на лихорадку денге (2012—2017 гг.).

По оси ординат — количество исследованных образцов. Образцы с положительными маркерами на лихорадку денге обозначены как темная часть столбиков. По оси абсцисс — временная шкала с разбивкой по месяцам, начиная с декабря 2012 г. по июнь 2017 г.



**Рис. 2.** Динамика изменения концентрации антивиральных IgG и IgM в сыворотках пациентов с завозными случаями лихорадки денге в различные сроки от начала заболевания.

Интенсивность сигнала в единицах оптической плотности (ОП±σ) в ИФА для IgM и IgG антител к вирусу денге, в сыворотках крови у больных лихорадкой денге.



**Рис. 3.** Диаграмма рассеяния значений ОП для IgG антител к вирусу денге в ИФА у пациентов в зависимости от срока начала заболевания.

Справа — гистограмма распределения числа случаев ( $n$ ) значений ОП.

лабораторных исследований все пробы подвергались кодированию. Исследования выполнялись в соответствии с приказом №88 от 17.03.2008 Роспотребнадзора.

Оценку различий между выборками проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни при помощи пакета R версии 3.3.3.

## Результаты и обсуждение

С 2012 по 2017 г. были собраны и исследованы 374 сыворотки крови пациентов из 44 регионов РФ, заболевших во время или сразу после возвращения из стран Юго-Восточной и Центральной Азии, Африки, Центральной и Ла-

Таблица. Сравнение последовательности штамма DENV-1/8/Thailand/01/2013 с тремя наиболее близкими по уровню гомологии нуклеотидной последовательности штаммами вируса денге из базы данных GenBank: 1/КН/ВІD-V4261/2007-Камбоджа, DENV-1/ВN/ВІD-V1913/2008-Вьетнам и ThD1\_0102\_01-Таиланд  
 Sequence comparison of the strain DENV-1/8 / Thailand / 01/2013 with the three dengue strains of the dengue virus from the GenBank database closest in homology to the nucleotide sequence: 1/КН/ВІD-V4261/2007-Cambodia, DENV-1/ВN/ВІD-V1913/2008-Vietnam and ThD1\_0102\_01-Thailand

Штамм [strain]	DENV-1/8/Thailand/01/2013 (KF887994) (Нуклеотидные/аминокислотные замены) [Nucleotide/Amino Acid Substitutions]														Геном
	5'-UTR	C	PrM	E	NSI	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	2k	NS4B	NS5	3'-UTR	Геном	
DENV-1/КН/ВІD-V4261/2007	66	342/114	498/166	1485/495	1056/352	654/218	390/130	1857/618	381/127	69/23	747/249	2697/899	366	10611/3392	
DENV-1/ВN/ВІD-V1913/2008	0/—	0/0	0/0	5/1	5/0	6/2	4/0	10/0	2/0	0/0	2/0	14/7	2/—	50/10	
ThD1_0102_01	0/—	1/0	1/1	6/1	6/0	5/3	3/0	13/1	3/0	0/0	3/0	15/8	1/—	57/14	
	0/—	2/1	0/0	21/3	20/1	11/4	5/0	32/2	11/1	1/0	6/2	58/17	3/—	170/31	

тинской Америки, Карибских островов, Новой Зеландии и Ближнего Востока и госпитализированных с подозрением на лихорадку денге. Возраст пациентов варьировал от 15 до 59 лет. В 160 образцах были обнаружены маркеры, один или несколько, характерные для лихорадки денге, а именно вирусная РНК, антиген NS1, вирусспецифические антитела IgG и/или IgM (рис. 1). В случае обнаружения одного из этих маркеров в образце пациенты считались положительными на лихорадку денге. На рис. 1 представлены временные ряды распределения количества лабораторно подтвержденных и подозрительных на лихорадку денге случаев за период 2012—2017 гг. Как видно из рис. 1, большая часть подозрительных и лабораторно подтвержденных случаев лихорадки денге приходится на зимний период, что связано с более активным посещением туристами различных стран Юго-Восточной Азии в этот период.

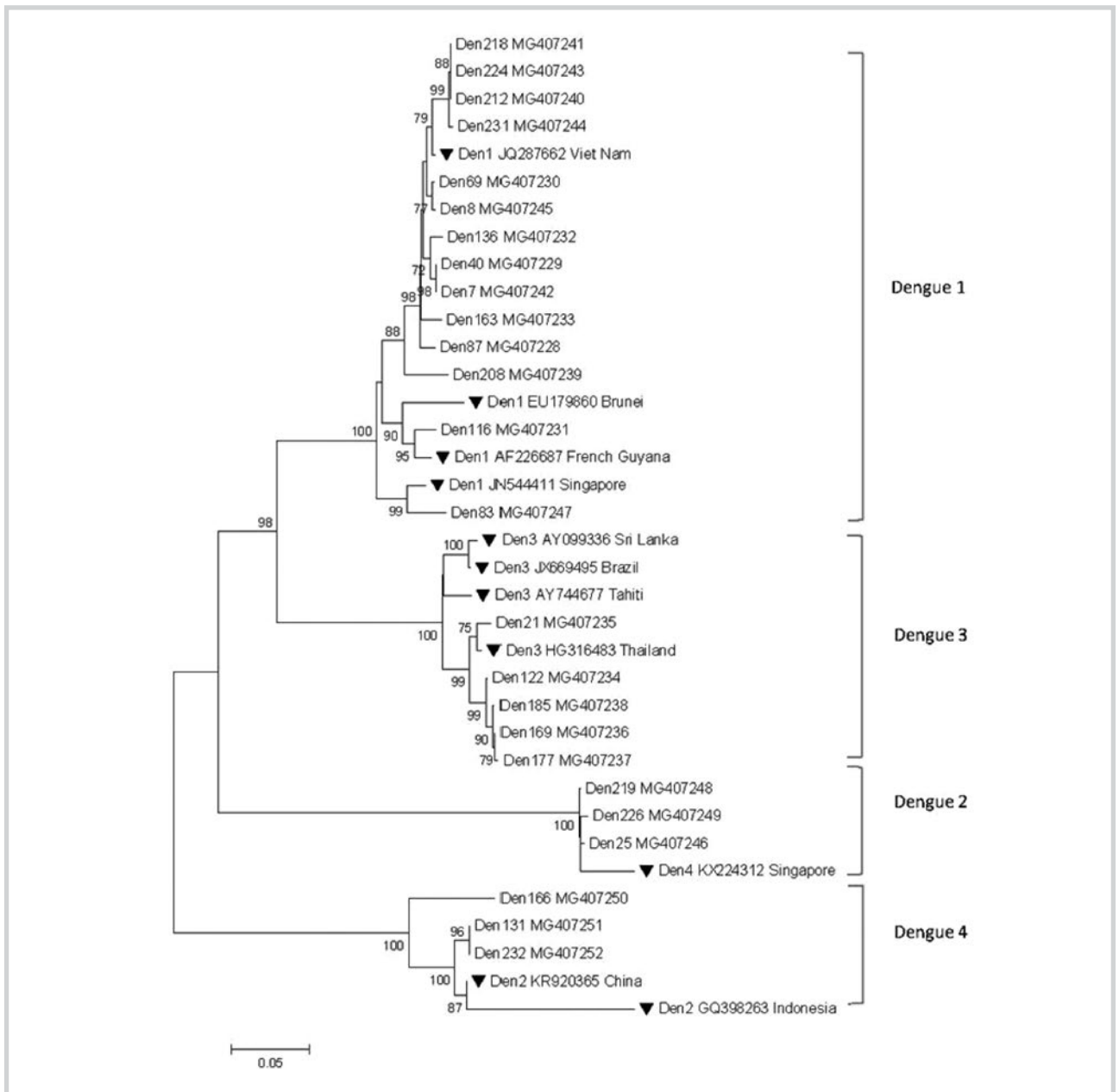
Ранее нами в образцах от пациентов с подозрением на лихорадку денге были обнаружены 3 образца, положительных на малярию, в 2 образцах была обнаружена РНК вируса Чикунгуньи, в 9 образцах — РНК вируса Зика. В 7 пробах были обнаружены специфические IgM к цитомегаловирусу, в 4 образцах содержались IgM к вирусу кори и в 5 обнаружены IgM к вирусу краснухи [5].

Эффективность выявления иммунологических и генетических маркеров лихорадки денге была различной. Так, метод ОТ ПЦР позволил выявить РНК вируса денге более чем у 1/2 (55%) пациентов. Маркер NS1 (только NS1, без других маркеров) методом ИХА был выявлен в 43 (26,9%) случаях. Специфические к денге IgM были обнаружены в 15 (9,3%) случаях, а IgG были выявлены в 4 (2,5%) образцах. Одновременно антиген NS1 и IgM антитела были найдены в 45 (28%) образцах, а присутствие IgM и IgG антител — в 24 (15%) образцах. Антиген NS1 вместе с IgM и IgG антителами был выявлен в 29 (18%) образцах.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные методы диагностики имеют различную эффективность выявления маркеров лихорадки денге у пациентов.

На рис. 2 представлены данные по тестированию IgM и IgG антител к вирусу денге, полученные с помощью ИФА. Высокие значения титров IgM к вирусу денге (с максимумом на 15—20-й день заболевания и постепенным снижением к 35—40-м суткам) совпадают с известными данными литературы [11]. Однако при выявлении IgG антител к вирусу денге было обнаружено, что на 7-й и 30-й дни заболевания регистрируются два максимума концентрации IgG антител. При этом между 10-м и 20-м днями от начала заболевания регистрируется падение концентрации IgG антител (см. рис. 2). Значение оптической плотности (ОП) для IgG к вирусу денге у пациентов со сроком заболевания в интервале 12—18-е сутки было значимо ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в интервале 0—11-е и 19—35-е сутки. Это существенно отличается от ранее описанной в литературе динамики появления противовирусных IgG при лихорадке денге, тогда как IgG к вирусу денге начинает существенно нарастать после 12—15-х суток от начала заболевания [1, 11].

Для уточнения особенностей формирования двух пиков концентрации IgG против вируса денге для завозных случаев лихорадки денге была составлена диаграмма рассеяния значений отдельных ОП в ИФА для IgG к вирусу денге (рис. 3). Как видно из представленных данных, точки отдельных значений концентрации IgG к вирусу денге, нанесенные на диаграмму, формируют два множества значений ОП, которые, по-видимому, отражают особенности иммунного ответа у человека на вирус денге.



**Рис. 4.** Филогенетическое дерево, построенное для генотипированных изолятов денге на основе сравнения с известными штаммами вируса денге, обозначенными черным треугольником.

Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

Для подтверждения результатов тестирования случаев лихорадки денге, полученных в ПЦР и ИФА, проводили генотипирование выделенных от пациентов изолятов вируса денге на основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 5'-конца (1-630 п.о.) вирусного генома (рис. 4). Все исследованные изоляты филогенетически были классифицированы в рамках основных 4 субтипов вируса денге. Заболевание лихорадкой денге у 22 пациентов было вызвано субтипом 1 вируса денге, субтип 2 вызвал инфекцию у 11 пациентов, субтип денге 3 — у 8 пациентов и денге субтипа 4 — у 6 пациентов. Это по-

зволило заключить, что завозные случаи лихорадки денге на территории РФ связаны с вирусами денге всех четырех субтипов, с небольшим превалированием случаев инфекции, вызванной вирусом денге субтипа 1.

Для выделенного штамма Den8 (DENV-1/8/Thailand/01/2013) было проведено полногеномное секвенирование. В таблице представлены данные сравнения последовательности изолята DENV-1/8/Thailand/01/2013 (KF887994) с тремя наиболее близкородственными изолятами: 1/KN/BID-V4261/2007-Камбоджа, DENV-1/VN/BID-V1913/2008-Вьетнам и ThD1\_0102\_01-Таиланд. Процент гомологии по

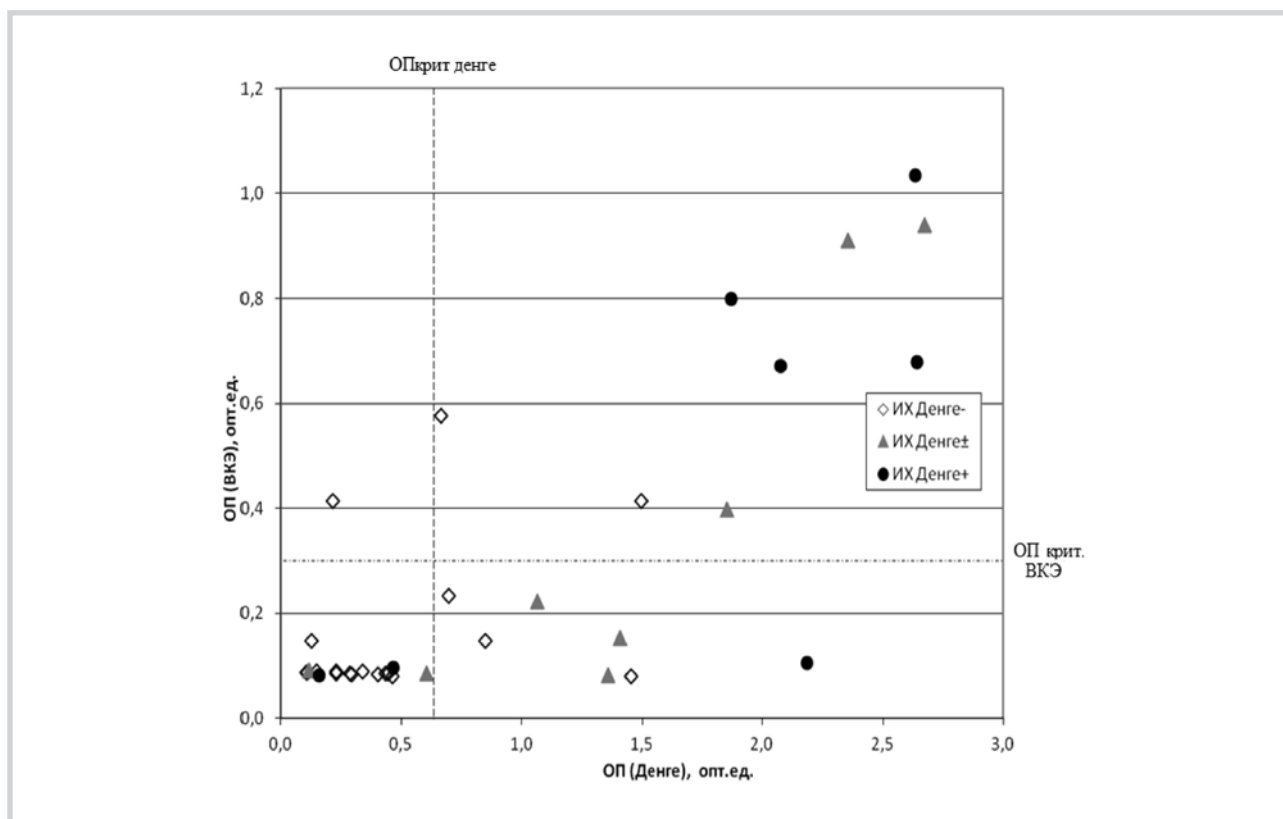


Рис. 5. Результаты ИФА анализа сывороток пациентов тест-системами на IgG к вирусу Денге (ОП денге) и на IgG к ВКЭ (ОП ВКЭ) и детекцией IgG к вирусу Денге методом ИХ.

◇ — результат отрицательный; △ — результат сомнительный; ○ — результат положительный.

нуклеотидным последовательностям составил 99% при сравнении с изолятами из Камбоджи и Вьетнама и 98% — с изолятом из Таиланда. Степень гомологии по аминокислотным последовательностям составила 99%. Штамм DENV-1/8/Thailand/01/2013 прошел 5 пассажей на клетках С6-36. При пассировании на клетках С6-36 по сравнению с исходным изолятом в нуклеотидной последовательности вируса были обнаружены адаптивные изменения. На третьем пассаже обнаружена вставка 18Т, а на четвертом — замещение С590G. По сравнению с известными штаммами вируса денге у изолята DENV-1/8/Thailand/01/2013 были обнаружены две уникальные аминокислотные замены — N75S и F682L. Полногеномное секвенирование штамма DENV-1/8/Thailand/01/2013 продемонстрировало наличие от 50—170 нуклеотидных и 10—31 аминокислотных замен у данного штамма в сравнении с известными прототипными последовательностями вируса денге суб-типа 1.

Наличие антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) характерно для населения эндемичных по клещевому энцефалиту регионов России [12]. Также описано наличие значительных антигенных перекрестов между различными флавивирусами, в том числе между вирусами денге и клещевого энцефалита [9]. Из 14 пациентов с ОП < 0,6 IgG к вирусу денге, IgG к ВКЭ нами были выявлены только в 1 случае (при ОП > 0,3) (см. рис. 3). При этом ОП крит. к денге составлял 0,6. В то же время присутствие IgG к ВКЭ (ОП > 0,3) было обнаружено у 9 из 17 пациентов с высоким титром IgG (ОП > 0,6) к вирусу денге, при ОП крит. к ВКЭ

0,4. На рис. 5 представлены результаты анализа сывороток пациентов ИФА тест-системами на IgG к вирусу денге (ОП денге) и на IgG к ВКЭ (ОП ВКЭ) в соотношении с результатами выявления IgG к вирусу денге методом ИХ. Из представленных данных видно, что чем выше у образцов ОП IgG к антигенам вируса денге, тем выше значение ОП IgG к антигенам ВКЭ. Это подтверждает наличие выраженных антигенных перекрестов между вирусом денге и ВКЭ. Наличие антител может также быть связано с предшествующей иммунизацией против ВКЭ или перенесенной ранее инфекцией, в том числе бессимптомной. Известно, что уровень иммунизации населения РФ против вируса клещевого энцефалита может варьировать в очень широких пределах и достигать 86,1%, как описано для населения Свердловской области [13]. К сожалению, нам не удалось установить наличие антител против ВКЭ у исследованных групп пациентов до начала заболевания лихорадкой денге.

Возможно, что первый пик концентрации IgG (см. рис. 2) связан с вторичным иммунным ответом после предшествующей флавивирусной инфекции или иммунизации. Такой характер распределения IgG к вирусу денге в сыворотках крови у больных лихорадкой денге может быть связан с наличием перекрестно реагирующих антител для ряда других флавивирусов [8, 9]. Известно, что в различных регионах РФ циркулируют ВКЭ, вирусы Повассан, лихорадки Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки [14—16]. Причем количество серопозитивных лиц, например к вирусу лихорадки Западного Нила, может достигать несколько десятков процентов в южных регионах РФ, а циркуляция вируса

лихорадки Западного Нила зарегистрирована практически повсеместно в южных регионах РФ [17]. Существование предшествующего иммунного ответа к флавивирусам может вызывать вторичный IgG иммунный ответ после инфицирования вирусом денге. Это предположение удовлетворительно объясняет регистрацию двух пиков концентрации антивирусных IgG, раннего и позднего, у пациентов с завозными случаями лихорадки денге.

Известно, что В-клеточный иммунный ответ против флавивирусов в основном направлен на вирусный гликопротеин E [18, 19], который обуславливает формирование перекрестно реагирующих антител для различных видов флавивирусов, в том числе вируснейтрализующих. Наличие вируснейтрализующих перекрестно реагирующих антител может индуцировать развитие антителозависимого усиления вирусной инфекции, с утяжелением клинической картины заболевания, с развитием геморрагических проявлений, синдрома Гийена—Барре и других иммунопатологических проявлений [8, 18].

Другим важным маркером выявления лихорадки денге служит обнаружение антигена NS1 вируса денге в сыворотке крови пациента. Мы обнаруживали антиген NS1 вируса денге методом ИХ в крови больных вплоть до 25-х суток после начала заболевания, хотя обычно антиген NS1 вируса денге можно устойчиво выявлять лишь до 10-х суток от начала заболевания [9, 11]. Возможно, что длительное присутствие маркера NS1 денге в крови у исследованных больных было связано с низким уровнем IgG к антигену NS1 вируса в ранний период заболевания. Только после нарастания концентрации IgG антител против антигена NS1 вируса денге в крови больных, обычно после 23-х суток, антиген NS1 вируса денге из крови больных исче-

зал. Другое возможное объяснение задержки элиминации NS1 антигена связано с перекрестно реагирующими антителами против флавивирусов, что задерживало развитие иммунного ответа на NS1 антиген.

## Выводы

1. В образцах сыворотки крови от пациентов, госпитализированных с подозрением на лихорадку денге, только совместное использование различных иммунологических маркеров лихорадки денге — вирусная РНК, NS1 антиген, IgM или IgG антитела — обеспечивало более эффективную диагностику лихорадки денге.

2. Представленные результаты подтверждают данные литературы о выраженных антигенных перекрестах между различными представителями флавивирусов, что может затруднить проведение ИФА диагностики ВКЭ и денге у пациентов.

3. Представленные результаты позволяют рекомендовать более широкие временные рамки (до 25-х суток) для детекции NS1 антигена вируса денге для завозных случаев лихорадки денге на территорию РФ.

Это исследование было поддержано Российской федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

This study was supported by the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. TDR/World Health Organization. 2009. [https://doi.org/10.1016/s0031-3025\(16\)34854-1](https://doi.org/10.1016/s0031-3025(16)34854-1)
- Ong SH. *Molecular Epidemiology of Dengue Viruses from Complete Genome Sequences*. PhD Thesis, University of Basel. 2010. <https://doi.org/10.5451/unibas-005222143>
- Берилло С.А., Демина О.К., Терновой В.А., Шиков А.Н., Сергеева Е.И., Демина А.В., Костина Н.Е., Винокурова А.В., Михеев В.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Случаи лихорадки денге на территории РФ в 2010—2011 гг. среди туристов, вернувшихся из Юго-Восточной Азии. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012;4:12-15.  
Berillo SA, Demina OK, Ternovoy VA, Shikov AN, Sergeeva EI, Demina AV, Kostina NE, Vinokurova AV, Mikheev VN, Agafonov AP, Sergeev AN. Dengue fever in the Russian Federation in travelers, returning from Southeast Asia in 2010—2011. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2012;4:12-15. (In Russ.).
- Хохлова Н.И., Краснова Е.И., Верейкина О.А., Есикова Е.Ю., Позднякова Л.Л., Патурина Н.Г., Берилло С.А., Семенцова А.О., Чаусов Е.В., Терновой В.А. Клинико-лабораторная характеристика завозных случаев лихорадки денге у жителей Новосибирска. *Инфекционные болезни*. 2013;11(2):81-85.  
Khokhlova NI, Krasnova EI, Vereykina OA, Esikova EYu, Pozdnyakova LL, Paturina NG, Berillo SA, Sementsova AO, Chausov EV, Ternovoy VA. Clinical-laboratory characteristic of imported cases of Dengue fever in Novosibirsk citizens. *Infectious Diseases*. 2013;11(2):81-85. (In Russ.).
- Пьянков С.А., Иванова Е.В., Терновой В.А., Агафонов А.П. Специфическая дифференциальная диагностика кори, краснухи, цитомегаловирусной инфекции и лихорадки денге у российских туристов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014;19(6):16-20.  
Pyankov SA, Ivanova EV, Ternovoy VA, Agafonov AP. Screening of blood serum for markers of infection with measles, rubella, cytomegalovirus and Dengue Fever in Russian tour. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;19(6):16-20. (In Russ.).
- Sergeeva EI, Ternovoi VA, Chausov EV, Berillo SA, Demina OK, Shikov AN, Plasunova IV, Kartashov MJ, Agafonov AP. Imported cases of dengue fever in Russia during 2010—2013. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(2):90-93. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60194-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60194-2)
- 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;1:35-38.  
Larichev VF, Saifullin MA, Akinshina YuA, Khutoretskaya NV, Butenko AM. Imported cases of arbovirus infections in the Russian Federation. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2012;1:35-38. (In Russ.).
- Бахметьева С.В., Пуховская Н.М., Здановская Н.И., Иванов Л.И., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Журавлев Я.А., Ларичев В.Ф. Этиологическая расшифровка завозных случаев тропических лихорадок в дальневосточном регионе. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014;25(25):91-93.  
Bakmeteva SV, Pukhovskaya NM, Zdanovskaya NI, Ivanov LI, Belozerovala NB, Utkina OM, Zhuravlev YaA, Larichev VF. Etiological decoding of imported cases of tropical fevers in the Far Eastern region. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2014;25(25):91-93. (In Russ.).
- Keasey SL, Pugh CL, Jensen SMR, Smith JL, Hontz RD, Durbin AP, Dudley DM, O'Connor DH, Ulrich RG. Antibody Responses to Zika Virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017;24(4):pii: e00036-17. <https://doi.org/10.1128/0014-8177>
- Ganushkina LA, Patraman IV, Rezza G, Migliorini L, Litvinov SK, Sergiev VP. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016;16(1):58-60. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1761>



11. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1990;3:376-396.
12. Лучинина С.В., Семенов А.И., Степанова О.Н., Погодина В.В., Герасимов С.Г., Шербинина М.С., Колесникова Л.И., Сулова Т.А. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15:1(86):67-76.  
Luchinina SV, Semenov AI, Stepanova ON, Pogodina VV, Gerasimov SG, Shcherbinina MS, Kolesnikova LI, Suslova TA. Vaccinal prevention of Tick-Borne Encephalitis in chelyabinsk Region: Dynamics of Vaccination, population Immunity, Analysis of TBE cases in Vaccinated persons. *Epidemiology and Vaccine Prevention*. 2016;15:1(86):67-76. (In Russ.).
13. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Свердловской области в 2016 г.». Екатеринбург. 2017;260.  
State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Sverdlovsk region in 2016». Yekaterinburg. 2017;260. (In Russ.).
14. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*. 2003;57:129-146.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1)
15. Локтев В.Б. Таксономия флавивирусов и их генетическое разнообразие. В кн.: Власова В.В., Репина В.Е. (ред.) *Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе*. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2011.  
Loktev V.B. Taxonomy of flaviviruses and their genetic diversity. In the book: Vlasov V.V., Repin V.E. (Ed.) *Tick-borne infections in the Siberian region*. Novosibirsk: Publishing House of the SB RAS; 2011. (In Russ.).
16. Leonova GN, Kondratov IG, Ternovoi VA, Romanova EV, Protopopova EV, Chausov EV, Pavlenko EV, Ryabchikova EI, Belikov SI, Loktev VB. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia. *Arch Virol*. 2009;154(5):811-820.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-009-0376-y>
17. Козлова А.А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Азарян А.Р., Гришанова А.П., Ивашенко 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;21(5):244-252.  
Kozlova AA, Butenko AM, Larichev VF, Azarian AR, Grishanova AP, Ivashchenko EI, Shendo GL, Dzagurova TK, Pilikova OM, Vasilenko NF. The study of the area of distribution of west nile virus in the territory of the European part of Russia; the results of seroepidemiological research. report 1: Astrakhan region, Krasnodar region, Stavropol region, Saratov region. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2016;21(5):244-252. (In Russ.).
18. Slon Campos JL, Poggianella M, Marchese S, Mossenta M, Rana J, Arnoldi F, Bestagno M, Burrone OR. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181734.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181734>
19. McAuley AJ, Sawatsky B, Ksiazek T, Torres M, Korva M, Lotrič-Furlan S, Avšič-Županc T, von Messling V, Holbrook MR, Freiberg AN, Beasley DWC, Bente DA. Cross-neutralisation of viruses of the tick-borne encephalitis complex following tick-borne encephalitis vaccination and/or infection. *NPJ Vaccines*. 2017;2:5.  
<https://doi.org/10.1038/s41541-017-0009-5>

Поступила 02.04.18

Received 02.04.18

После доработки 23.12.18

Revised 23.12.18

Принята к печати 23.02.19

Accepted 23.02.19