



Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики

Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н., Трухин В.П., Игнатъев Г.М.✉

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Арбовирусные инфекции представляют собой проблему для здравоохранения не только отдельных стран, но и всего мира в связи с повторяющимися вспышками в последнее десятилетие.

Целью настоящей работы было серологическое исследование распространённости вирусов денге (ДЕНВ), Зика (ЗИКВ), жёлтой лихорадки (ЖЛВ) и Чикунгунья (ЧИКВ) на примере ограниченной выборки в Никарагуа.

Материалы и методы. Одновременно были исследованы 200 образцов сывороток крови, собранные в Никарагуа. Использовались доступные коммерческие диагностические наборы, а также *in house*-методы. Антитела (АТ) в положительных образцах сывороток оценивали по уровню авидности после обработки 8М мочевиной.

Результаты. АТ к одному или к нескольким вирусам одновременно имели 85 (42,5%) образцов. Индекс авидности (ИА) $\geq 30\%$ был у 46 (23%) образцов, содержащих АТ только к одному вирусу. Из 39 (19,5%) образцов, содержащих АТ к нескольким вирусам, только 19 (9,5%) образцов содержали АТ с ИА $\geq 30\%$ сразу к нескольким вирусам; 16 (8,0%) образцов имели АТ с высоким ИА к ДЕНВ и одновременно АТ с ИА $< 30\%$ к ЗИКВ и/или к ЖЛВ.

Обсуждение. Результаты анализа сывороток в тестах иммуноферментного анализа были скорректированы, т.к. только АТ с высоким ИА подтверждают инфицирование в анамнезе. Анализ авидности специфических АТ способствовал не только подтверждению случаев сочетанного или последовательного инфицирования в анамнезе, но и выявлению феномена кросс-реактивности АТ к флавивирусам. Наличие кросс-реактивных АТ, с одной стороны, мешает получить истинную картину инфицирования популяции флавивирусами, а с другой стороны, может увеличивать риск антителозависимого усиления заболевания, которое известно при вторичной лихорадке денге и при последовательном заражении ДЕНВ и ЗИКВ.

Заключение. Анализ авидности специфических АТ позволил подтвердить инфицирование в прошлом, в том числе несколькими вирусами, а также дифференцировать АТ с низкой авидностью, которые, вероятно, отражают феномен кросс-реактивности АТ к флавивирусам.

Ключевые слова: вирус Зика, вирус денге, вирус Чикунгунья, вирус желтой лихорадки, авидность, кросс-реактивность антител

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н., Трухин В.П., Игнатъев Г.М. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):215–224.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua — virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis

Alena V. Atrasheuskaya, Elena V. Kazakova, Ekaterina N. Zhirenkina, Victor P. Trukhin, Georgy M. Ignatyev[✉]

Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Arboviral infections are a rising public health concern not only for some individual countries, but also for the entire world due to the repeated outbreaks over the past decade.

The aim was to conduct a seroprevalence study of Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Yellow fever (YFV) and Chikungunya (CHIKV) viruses using a limited number of samples in Nicaragua.

Materials and methods. Total 200 serum samples collected previously in Nicaragua were analyzed simultaneously. Commercially available diagnostic kits, as well as *in-house* methods were used. The avidity of antibodies (IgG) in positive serum samples was assessed after the treatment with 8M urea.

Results. 85 serum samples (42.5%) contained IgG antibodies to one or several viruses simultaneously. IgG antibodies only to one virus were detected in 46 serum samples (23%) with the avidity index (AI) $\geq 30\%$. Among 39 samples (19.5%) that contained IgG antibodies to several viruses, only in 19 samples (9.5%) IgG antibodies with high AI ($\geq 30\%$) to several viruses were detected. In 16 serum samples (8.0%), IgG antibodies to DENV with a high AI and antibodies to ZIKV and/or YFV with a low AI $< 30\%$ were detected.

Discussion. The results obtained in ELISA testing were corrected, since only IgG antibodies with a high AI confirm the past infection. The analysis of the specific IgG antibody avidity helped not only to confirm the cases of combined or sequential infection in the past, but also to discriminate the cross-reactive IgG antibodies induced by closely related DENV, ZIKV and YFV. The presence of cross-reactive IgG antibodies, on the one hand, make it difficult to determine the real seroprevalence of flavivirus infections, and, on the other hand, may increase the risk of antibody-dependent enhancement (ADE) of the disease, which is well-known for the secondary Dengue fever and for the consecutive infection with DENV and ZIKV.

Conclusion. The analysis of virus-specific antibody avidity made it possible not only to distinguish recent from the past infection, but also to discriminate the cross-reactive antibodies with the low avidity.

Keywords: Zika, Dengue, Chikungunya, Yellow fever viruses, IgG avidity and cross-reactivity

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Atrasheuskaya A.V., Kazakova E.V., Zhirenkina E.N., Trukhin V.P., Ignatyev G.M. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua — virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):215–224.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>

Введение

Арбовирусные инфекции представляют собой проблему для здравоохранения не только отдельных стран, но и всего мира в связи с повторяющимися вспышками в последнее десятилетие. Заражение вирусом денге (ДЕНВ) когда-то было редкостью, а теперь лихорадка денге считается одной из наиболее распространённых арбовирусных инфекций в мире, передача которой происходит в 128 странах, где риску подвергаются почти 4 млрд человек. ДЕНВ на данном этапе не просто эндемичен, а «гиперэндемичен» во многих регионах тропиков и субтропиков [1]. Очередное появление вируса Чикунгуния (ЧИКВ) в Карибском бассейне в 2013 г. привело к его быстрому распространению в 45 странах

Северной, Центральной и Южной Америки [2]. После этого глобальное внимание привлёк вирус Зика (ЗИКВ), также из-за быстрого распространения в 22 странах Северной и Южной Америки с момента его первого обнаружения в 2015 г. в Бразилии [2–4].

Комары — главный переносчик этих инфекционных заболеваний. Комары *Aedes aegypti* ответственны за распространение инфекций в городских районах, а комары *A. albopictus* являются основным вектором распространения в сельской местности. Такие факторы, как глобальное потепление, вырубка лесов и урбанизация, ведут к росту распространения арбовирусных инфекций. Учитывая возрастающее количество случаев и социально-экономическое влияние вспышек арбовирусных инфекций,

оценка их истинного бремени на систему здравоохранения представляет крайне важную задачу. Ситуация осложняется тем, что арбовирусные инфекции симптоматически, особенно на начальной стадии, часто очень схожи, что затрудняет постановку клинического диагноза, особенно когда одновременно циркулируют несколько арбовирусов [3–5]. Арбовирусные инфекции нередко протекают субклинически, бессимптомно проходят до 75% случаев ДЕНВ, до 25% — ЧИКВ и до 80% — ЗИКВ [1, 3, 6]. Клинические проявления и симптомы в начале заболевания проявляются как неспецифическое и лёгкое лихорадочное состояние с мышечными болями, артралгиями, иногда с сыпью или конъюнктивитом/ретроорбитальной болью. Верификация клинического диагноза происходит в основном при попадании пациента в клинику уже в тяжёлом состоянии. Таким образом, установление окончательного диагноза в эндемичной зоне совместной циркуляции арбовирусных инфекций является проблемой, учитывая схожесть симптомов и вероятность перекрёстной реакции в серологических тестах, что затрудняет определение реального влияния этих вирусов на население многих субтропических и тропических стран и истинных масштабов эпидемий [3, 6, 7]. Данные о распространённости арбовирусных инфекций важны для понимания не только их географического распространения, но и влияния на глобальную заболеваемость и смертность. Такая информация имеет решающее значение для определения оптимального распределения имеющихся ресурсов здравоохранения для борьбы с инфекционными заболеваниями и оценки воздействия стратегии профилактики, например, вакцинации.

ДЕНВ, ЗИКВ и вирус жёлтой лихорадки (ЖЛВ) относятся к одному семейству *Flaviviridae*. Их родство может вызывать перекрёстную реакцию в серологических тестах, затрудняя клиническую диагностику [7–9]. В 1948–1952 гг. до Никарагуа докатилась «волна» жёлтой лихорадки из Панамы. В преддверии эпидемии в стране были иммунизированы 112 тыс. сельских жителей [10, 11]. Данный факт не позволяет исключить циркуляцию 3 вирусов одного семейства в Никарагуа.

Появление в 2014 г. лихорадки Чикунгунья в Никарагуа и последовавшая вслед за этим в 2015–2016 гг. масштабная вспышка привлекла внимание региональных эпидемиологов и врачей, т.к. это заболевание нередко сопровождается поражением скелетно-мышечной системы, последствиями которой могут длиться от нескольких месяцев до года и даже приводить к утрате трудоспособности [12, 13]. Проведено несколько достаточно масштабных клинико-лабораторных исследований распространённости лихорадки Чикунгунья [13], а также исследований по дифференциальной молекулярно-биологической и клинической диагностике лихо-

радок денге, Зика и Чикунгунья [12–14] в Никарагуа. В клиническом исследовании, проведённом в 2016 г., в более чем 20% случаев выявлено сочетанное инфицирование 2–3 арбовирусами, что часто определяло тяжесть клинического течения заболевания [13].

Серологические исследования иммунитета населения дополняют традиционные клинические и лабораторные исследования и являются альтернативным подходом к мониторингу не только уровня иммунитета в популяции к тому или иному инфекционному агенту, но и распространённости инфицирования этими агентами, что, соответственно, позволяет оценить их влияние на здравоохранение.

Целью настоящей работы было серологическое исследование распространённости ДЕНВ, ЗИКВ, ЖЛВ и ЧИКВ на примере ограниченной выборки в Никарагуа.

Материалы и методы

Для проведения слепого скринингового исследования были использованы образцы сывороток крови, собранные в 2019 г. (до пандемии COVID-19) от лиц старше 18 лет перед проведением кампании по вакцинации против гриппа на территории Никарагуа. Образцы были зашифрованы и хранились при -70°C для последующего одномоментного исследования. Отбор 200 образцов сывороток для настоящего исследования был произведён вслепую. Таким образом, возраст и пол участников, анамнестические данные о перенесённых ранее заболеваниях, в том числе передающихся комарами (лихорадка денге, Зика, Чикунгунья, жёлтая лихорадка), не учитывались. В ходе проведения кампании по вакцинации за участниками проводился пассивный мониторинг в течение 28 дней, что исключает наличие образцов от лиц с острыми инфекционными заболеваниями.

Все сыворотки были исследованы на наличие антител (АТ) к вирусу SARS-CoV-2, а также к ЗИКВ, ЧИКВ, ДЕНВ и ЖЛВ с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА). В работе использовали следующие доступные коммерческие диагностические наборы в соответствии с инструкциями производителей:

- «БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» («Биосервис») — для определения АТ (IgG) к вирусу Чикунгунья;
- «БиоСкрин-Денге (IgG)» («Биосервис») — для определения АТ (IgG) к вирусу денге;
- «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)» («Euroimmun AG») — для определения АТ (IgG) к ЗИКВ.
- «Qualitative Human Yellow Fever Virus Antibody IgG (YFV-IgG) ELISA Kit» («MyBioSource Inc.») — для определения АТ (IgG) к ЖЛВ.

Все сыворотки с неоднозначными результатами в каком-либо тесте оценивались повторно. Сыворотки, положительные в одном тесте, оценивали

как моносыыворотки, положительные в нескольких тестах — как полисыыворотки.

АТ в положительных образцах сыывороток оценивали по уровню авидности по ранее описанной методике [14] с 8М мочевиной. Индекс авидности (ИА) рассчитывали как отношение оптической плотности при проведении ИФА до и после обработки мочевиной.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016» и пакета программ «StatTech». Данные ИА специфических АТ представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения среднего (SD). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, с двумя хвостами распределения (U -test) при сравнении двух групп. При малой выборке в группе (< 3) достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, непарного, с двумя хвостами распределения (t -test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Из 200 исследованных образцов сыывороток 115 (57,5%) оказались отрицательными во всех тестах. Из 85 положительных образцов сыывороток (42,5% от общего числа) 53 образца оказались положительными в тесте с ЧИКВ (26,5% от общего числа; 62,4% от числа положительных образцов); 41 образец был положительным в тесте с ДЕНВ (20,5% от общего числа; 48,2% от числа положительных образцов); 25 образцов были положительными в тесте с ЖЛВ (12,5% от общего числа; 29,4% от числа положительных образцов); 24 образца были положительными в тесте с ЗИКВ (12,0% от общего числа; 28,2% от числа положительных образцов).

В табл. 1 представлены результаты тестирования образцов сыывороток крови в 4 тестах ИФА. АТ только к одному вирусу были обнаружены в 46 образцах сыывороток (23% от общего числа; 54,1% от числа положительных образцов). Остальные 39 образцов сыывороток (19,5% от общего числа; 45,9% от числа положительных образцов) содержали АТ к 2–4 вирусам одновременно. Четыре образца имели АТ ко всем используемым в данном исследовании вирусам. В табл. 1 представлены все варианты сочетания АТ сразу к нескольким вирусам в одном образце. Наличие АТ к ДЕНВ одновременно с АТ к другим вирусам наблюдалось чаще всего (28 образцов). Наличие АТ к ЗИКВ одновременно с АТ к другим вирусам наблюдалось в 18 образцах, практически так же, как и сочетание АТ к ЖЛВ с АТ к другим вирусам (17 образцов).

Полученные результаты могли бы свидетельствовать о достаточно частом сочетанном и/или по-

следовательном инфицировании в различных комбинациях, однако проведённый анализ авидности представил результаты несколько в ином ракурсе. Результаты оценки авидности специфических АТ в образцах с положительным результатом только в одном тесте ИФА представлены в табл. 2. Все образцы моносыывороток имели ИА специфических АТ $\geq 30\%$, за исключением одного образца, у которого ИА в тесте с ЖЛВ был 28%. Таким образом, этот показатель (ИА $\geq 30\%$) был расценён как высокий, свидетельствующий о перенесённом заболевании.

Результаты оценки авидности специфических АТ в образцах с положительным результатом в нескольких тестах ИФА представлены в табл. 3. В образцах полисыывороток самый высокий ИА был у АТ к ЧИКВ, причём на том же уровне, что и в соответствующих образцах моносыывороток ($p > 0,05$). Из 39 образцов полисыывороток ИА $\geq 30\%$ наблюдался только к ЧИКВ и ДЕНВ одновременно. Таких образцов было 15. Данный результат позволяет предположить наличие в анамнезе сочетанного или последовательного инфицирования ДЕНВ и ЧИКВ.

В 3 образцах с высоким ИА АТ к ЧИКВ (48–63%) были также обнаружены АТ к ЗИКВ с низким ИА ($\leq 30\%$); и в 1 образце с высоким ИА АТ к ЧИКВ (62%) были обнаружены также АТ к ЖЛВ с ИА = 30%. Результаты исследования этих 4 образцов позволяют предположить наличие в анамнезе сочетанного или последовательного инфицирования, т.к. ЧИКВ не относится к флавивирусам и перекрёстная реакция в ИФА маловероятна.

Таким образом, 19 образцов продемонстрировали наличие АТ к ЧИКВ и одновременно наличие АТ к 1 из 3 флавивирусов, что представляет 9,5% от общего числа образцов и 22,4% от числа положительных образцов. То есть из 39 положительных образцов в нескольких тестах ИФА только в 19 образцах можно предположить наличие сочетанных или последовательных контактов с несколькими вирусами в анамнезе.

В 16 образцах полисыывороток были обнаружены АТ к ДЕНВ с высоким ИА (32–52%) и сопутствующими АТ к ЗИКВ или к ЖЛВ с низким ИА ($\leq 24\%$). Интересно, что в данной группе образцов ИА АТ к ДЕНВ был достоверно выше ($p < 0,01$), чем аналогичный показатель в группе моносыывороток (табл. 3). Полученные в этих 16 образцах (18,8% от всех положительных образцов) результаты позволяют предположить наличие в анамнезе ДЕНВ-инфекции и наличие перекрёстных АТ в ИФА с ЗИКВ и ЖЛВ. На наш взгляд, перекрёстную реакцию можно объяснить наличием высокоавидных АТ к ДЕНВ. Интересно, что в 10 образцах с АТ с ИА $\geq 30\%$ к ДЕНВ обнаруживались АТ с низким ИА сразу и к ЖЛВ, и к ЗИКВ. Ни один образец сыыворотки не имел высокого ИА АТ ($\geq 30\%$) к флавивирусам в нескольких тестах одновременно.

Таблица 1. Результаты тестирования образцов сывороток крови на наличие АТ к ЧИКВ, ДЕНВ, ЖЛВ и ЗИКВ
Table 1. Results of serum samples testing for antibodies to CHIKV, DENV, YFV and ZIKV

Результаты исследований образцов в 4 тестах ИФА Samples' results in 4 ELISA tests	<i>n</i>	Доля от общего количества образцов (<i>n</i> = 200), % % from total number of samples (<i>n</i> = 200)	Доля от общего количества положительных образцов (<i>n</i> = 85), % % from number of positive samples (<i>n</i> = 85)	Доля от образцов, положительных к нескольким вирусам (<i>n</i> = 39), % % from number of samples positive in several tests (<i>n</i> = 39)
Образцы, отрицательные во всех тестах Samples negative in all tests	115	57,5	–	–
Образцы положительные Positive samples	85	42,5	–	–
Образцы, положительные в одном тесте ИФА Samples positive in one test	46	23,0	54,1	–
ЧИКВ / CHIKV	33	16,5	38,8	–
ДЕНВ / DENV	8	4,0	9,4	–
ЖЛВ / YFV	4	2,0	4,7	–
ЗИКВ / ZIKV	1	0,5	1,2	–
Образцы, положительные в нескольких тестах ИФА Samples positive in several tests	39	19,5	45,9	–
образцы, положительные в 2 тестах ИФА samples positive in two tests	25	12,5	29,4	64,1
ДЕНВ + ЗИКВ DENV + ZIKV	7	3,5	8,2	17,9
ДЕНВ + ЖЛВ DENV + YFV	7	3,5	8,2	17,9
ЧИКВ + ДЕНВ CHIKV + DENV	5	2,5	5,9	12,8
ЧИКВ + ЗИКВ CHIKV + ZIKV	3	1,5	3,5	7,7
ЧИКВ + ЖЛВ CHIKV + YFV	1	0,5	1,2	2,6
ЖЛВ + ЗИКВ YFV + ZIKV	1	0,5	1,2	2,6
образцы, положительные в 3 тестах ИФА samples positive in three tests	10	5,0	11,8	25,6
ДЕНВ + ЖЛВ + ЗИКВ DENV + YFV + ZIKV	4	2,0	4,7	10,2
ЧИКВ + ДЕНВ + ЖЛВ CHIKV + DENV + YFV	3	1,5	3,5	7,7
ЧИКВ + ДЕНВ + ЗИКВ CHIKV + DENV + ZIKV	2	1,0	2,4	5,2
ЧИКВ + ЗИКВ + ЖЛВ CHIKV + ZIKV + YFV	1	0,5	1,2	2,6
образцы, положительные в 4 тестах ИФА samples positive in 4 tests	4	2,0	4,7	10,3

Четыре образца, не содержащие АТ к ДЕНВ, имели АТ и к ЖЛВ, и к ЗИКВ одновременно. Причём ИА к ЗИКВ был 28–30% при ИА к ЖЛВ 18–20% соответственно. Можно предположить, что более высокий ИА свидетельствует об инфицировании в анамнезе, а более низкий ИА — о кросс-реактивности специфических АТ. Однако только динами-

ческое наблюдение помогло бы подтвердить данное предположение.

Таким образом, из 200 проанализированных образцов сывороток в 53 (26,5%) случаях имелись АТ к ЧИКВ с высоким ИА, что свидетельствует об инфицировании в анамнезе. На основании наличия специфических АТ с высоким ИА к ДЕНВ в 33 об-

Таблица 2. Результаты анализа ИА в образцах сывороток, положительных в одном тесте ИФА**Table 2.** Results of AI analysis in serum samples positive in one ELISA test

Тест ИФА / ELISA test	Количество положительных образцов Number of positive samples	ИА, % / AI, %	
		пределы / range	$M \pm SD$
«БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» «BioScreen-Chikungunya (IgG)»	33	38–66	54,4 ± 8,2
«БиоСкрин-Денге (IgG)» «BioScreen-Dengue (IgG)»	8	30–38	32,0 ± 2,6
«YFV-IgG»	4	28–33*	30,3 ± 2,5**
«Anti-Zika Virus ELISA (IgG)»	1	30	30

Примечание. *В одном образце ИА составил 60%; **без учёта образца с ИА 60%.

Note. *In one sample AI was as high as 60%; **excluding sample with AI 60%.

Таблица 3. Результаты анализа ИА в образцах сывороток, положительных в нескольких тестах ИФА**Table 3.** Results of AI analysis in serum samples positive in several ELISA tests

Тест ИФА / ELISA test	Количество положительных образцов Number of positive samples	ИА, % / AI, %	
		пределы / range	$M \pm SD$
«БиоСкрин-Чикунгунья (IgG)» «BioScreen-Chikungunya (IgG)»	19	40–63	53,2 ± 7,9*
«БиоСкрин-Денге (IgG)» «BioScreen-Dengue (IgG)»	31	36–52	39,9 ± 6,2**
«YFV-IgG»	21	14–30	23,3 ± 5,9***
«Anti-Zika Virus ELISA (IgG)»	23	14–32	19,3 ± 3,7****

Примечание. *–**** — сравнение с соответствующими показателями в образцах сывороток, положительных в одном тесте ИФА, в табл. 1. * $p > 0,05$ (U-test), ** $p < 0,001$ (U-test), *** $p < 0,05$ (U-test), **** $p < 0,05$ (t-test).

Note. *–**** — in comparison with the corresponding parameters in the samples positive in one ELISA test, shown in Table 1. * $p > 0.05$ (U-test), ** $p < 0.001$ (U-test), *** $p < 0.05$ (U-test), **** $p < 0.05$ (t-test).

разцах (16,5% от общего числа образцов и 38,8% от числа положительных образцов) можно сделать вывод об инфицировании ДЕНВ в анамнезе. Контакт с ЖЛВ или вакцинацию в анамнезе с большой долей вероятности можно предположить в 5 случаях (2,5% от общего числа образцов и 5,9% от числа положительных образцов), о чём свидетельствуют 4 образца моносывороток и 1 образец сыворотки с АТ и к ЧИКВ, и к ЖЛВ. Контакт с ЗИКВ весьма вероятен был в 4 случаях (2,0% от общего числа образцов и 2,4% от числа положительных образцов), о чём свидетельствуют 1 образец моносыворотки и 3 образца сывороток с АТ и к ЗИКВ, и к ЧИКВ. Обнаруженные в 19 образцах сывороток сочетания АТ, при исключении перекрёстной реакции на основании анализа avidности специфических АТ, продемонстрировали вероятность сочетанного или последовательного инфицирования несколькими вирусами в 22,4% положительных образцов сывороток.

Обсуждение

Жёлтая лихорадка и лихорадка денге — «старые» инфекционные заболевания, и исторически они были серьёзными проблемами для общественного здравоохранения. ДЕНВ и ЖЛВ вызывали ши-

роко распространённые эпидемии в XVII–XIX вв. и в начале XX в. Первоначальное географическое распространение ДЕНВ и ЖЛВ было тесно связано с судоходством и торговлей, что привело к глобальному распространению комаров *Aedes* из Африки в другие части тропиков в XVII–XVIII вв. [15, 16]. Случаи жёлтой лихорадки с фатальным исходом были документально зарегистрированы в Никарагуа в 1952 г. [10, 11]. Лихорадка денге, причём все 4 серотипа ДЕНВ, постоянно регистрируется в Никарагуа с 1985 г. [16–18]. Лихорадка Чикунгунья впервые была зарегистрирована в Никарагуа в 2014 г. С 2016 г. ЗИКВ циркулирует на территории страны, когда впервые был зарегистрированы автохтонные случаи лихорадки Зика [9].

В проведённом ретроспективном исследовании из 200 образцов сывороток, собранных в Никарагуа в 2019 г., значительное число (42,5%) содержало АТ к одному или нескольким арбовирусам; из них 62,4% содержали АТ с высоким уровнем avidности к ЧИКВ. Данный результат достаточно ожидаем, учитывая эпидемию лихорадки Чикунгунья в 2015–2016 гг. В исследовании, которое проводилось в разгар этой эпидемии в 2015 г. в Манагуа и окрестностях, серологическая распространённость инфицирования ЧИКВ в зависимости от района достига-

ла 1,5—17,5% [12]. Известно, что с возрастом количество серопозитивных лиц становится всё больше [6, 12]. В нашем исследовании образцы сывороток были собраны от лиц старше 18 лет в разных районах Никарагуа и после 2 лет эпидемии. Этими факторами можно объяснить достаточно большую долю сывороток, положительных к ЧИКВ, — 26,5%. На втором месте, также ожидаемо, были образцы с АТ и высоким ИА к ДЕНВ — 16,5%. В Никарагуа в период первой вспышки ЧИКВ также собирались образцы сывороток от пациентов, обратившихся за медицинской помощью, с первичным диагнозом лихорадки Зика, денге и Чикунгунья, и, ожидаемо, больше всего было инфицированных ЧИКВ, но количество пациентов, инфицированных ДЕНВ, также было ненамного меньше [9]. В этом же исследовании при анализе случаев обращения за медицинской помощью зарегистрировано 41,7–50,5% случаев сочетанного инфицирования разными вирусами. Также случаев госпитализации было достоверно больше среди пациентов с сочетанным инфицированием относительно таковых с моноинфекцией — 83,3% против 64% соответственно [9]. В нашем исследовании при исключении перекрёстной реакции методом анализа avidности специфические АТ к двум вирусам одновременно были обнаружены в 22,4% образцов сывороток от числа положительных. Ни один из образцов не содержал АТ с ИА $\geq 30\%$ сразу к 3 или 4 вирусам.

В целом результаты данного ретроспективного исследования подтвердили распространённость лихорадки Чикунгунья и лихорадки денге, а также одновременное циркулирование не только ДЕНВ и ЧИКВ на территории Никарагуа. Ранее J.J. Waggoner и соавт. продемонстрировали инфицирование пациентов ЧИКВ и ДЕНВ, а также ЗИКВ, в том числе сочетанное [9]. Одновременное циркулирование ЧИКВ, ДЕНВ, ЗИКВ, а также вероятность появления ЖЛВ не только создаёт сложную эпидемическую ситуацию в стране, но и доставляет много проблем для местного здравоохранения. Достаточно большое количество серологических исследований циркуляции ЧИКВ одновременно с флавивирусами, а также работ по разработке дифференциальной клинической и лабораторной диагностики лихорадок со схожими начальными клиническими симптомами проводится исследователями в странах Центральной и Южной Америки [9, 14, 19–21], а также Европы, учитывая активный мировой туризм [6, 14].

Усиление аффинности и соответствующие изменения avidности IgG в течение инфекционного процесса дают возможность предположить период, прошедший с момента первичного контакта с возбудителем инфекционного заболевания. На ранних стадиях иммунного ответа появляются IgG с низкой avidностью, которая растёт с течением времени и

свидетельствует о формировании зрелого специфического иммунного ответа [22].

Исследования, проведённые с начала до середины 1980-х гг., привели к использованию avidности IgG в качестве инструмента не только в клинической диагностике [23–25]. Исследователи флавивирусных инфекций используют avidность IgG для дискриминации первичной и вторичной лихорадки денге [19], дифференцирования недавнего и давнего инфицирования вирусом Западного Нила [26], изучения иммунного ответа при острой и хронической формах лихорадки Чикунгунья [12], а также анализа кросс-реактивности между АТ к флавивирусам с целью оценки распространённости той или иной лихорадки в регионе [14, 21, 27].

Ограниченное серологическое исследование распространённости инфицирования арбовирусами мы дополнили анализом avidности специфических АТ для дискриминации реального инфицирования в анамнезе от кросс-реактивности АТ к флавивирусам ДЕНВ, ЖЛВ и ЗИКВ. Поскольку в нашем исследовании все лица находились под пассивным наблюдением и ни у одного привитого на момент вакцинации и в течение 28 дней после вакцинации не отмечалось признаков или жалоб, характерных для острого инфекционного заболевания, можно предположить, что специфические АТ с низким ИА в том или ином тесте ИФА свидетельствовали не об острой стадии инфекционного заболевания, а, скорее всего, явились результатом их кросс-реактивности. Однако следует отметить, что исследование образцов сывороток было однократным и мы не можем исключить вариант течения бессимптомного инфекционного процесса, что особенно характерно для лихорадки Зика.

Распространение лихорадки Зика привело к необходимости разработки высокоспецифических ИФА-тест-систем с низким уровнем кросс-реактивности, в частности, между IgG к ДЕНВ (всем 4 типам) и ЗИКВ, т.к. на ранних этапах эти инфекции трудноразличимы клинически, а серология из-за кросс-реактивности АТ не всегда даёт реальную картину, притом что инфицирование ЗИКВ ассоциировано с врождённой микроцефалией, мертворождением и развитием синдрома Гийена–Барре у взрослых [28, 29].

Для дифференциальной лабораторной диагностики флавивирусных лихорадок были разработаны мультиплексная тест-система «pan-Flavi» [14], тест-система «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)» («Euroimmun AG»), в которых, как и в описанных ранее методах [19, 21], используются NS1-антигены. Это позволило с определённой степенью достоверности дискриминировать флавивирусы между собой в серологических тестах [8, 14]. В нашем исследовании мы использовали коммерческую тест-систему «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)», кото-

рая ранее применялась для серологической характеристики лихорадки Зика, в том числе для анализа авидности специфических АТ [27]. Для определения АТ к ДЕНВ и ЖЛВ мы использовали имеющиеся коммерческие тест-системы. В них в качестве антигена служит инактивированный вирус, что, безусловно, повлияло на результат в ИФА-тестах. Однако, по нашему мнению, анализ авидности специфических АТ к ДЕНВ и ЖЛВ позволяет минимизировать ошибку, т.к. кросс-реактивные АТ, как правило, являются низкоавидными и, соответственно, выявляются после обработки мочевиной.

Результат анализа авидности значительно зависит от молярности использованной мочевины [14, 21, 27]. Ранее W. Ya. Tsai и соавт. выявили, что 4М, 6М и 8М мочевины практически одинаково влияют на авидность специфических АТ к ЗИКВ [21]. В большинстве исследований авидности АТ к флавивирусам, как и в нашем исследовании, используется 8М мочевины [14, 19, 21, 27].

Изначально мы определили, что образцы сывороток, содержащие АТ только к одной инфекции, имели ИА специфических АТ $\geq 30\%$, и далее мы приняли этот уровень за высокий, характерный для постинфекции. Полученные нами результаты сопоставимы с ранее опубликованными, где на клинических данных пороговый уровень ИА АТ к ЗИКВ и ДЕНВ в одних исследованиях был определён как 24,5% [19], а в других исследованиях — 28% [21]. Известно, что ИА растёт с течением времени вплоть до 6 мес от момента заболевания [19, 21], выходя затем на плато [22].

Очень насущно стоит вопрос о стандартизации метода оценки авидности АТ, т.к. использование разных антигенов, буферов, конъюгатов в значительной степени влияет на результат и возможность сравнения результатов разных исследователей [22]. Для ряда инфекционных заболеваний, например для краснухи, разработаны протоколы для тестирования авидности IgG с использованием стандартизированных тестов и систем. Для флавивирусных инфекций на данном этапе решением проблемы стандартизации метода оценки авидности АТ может быть создание соответствующих панелей аттестованных сывороток. Такие панели могли бы обеспечить общий стандарт, по которому можно было бы не только проводить оценку авидности специфических АТ, но и разработать общую категоризацию авидности [14].

В популяциях с высокой распространённостью флавивирусных инфекций крайне не просто бывает не только клинически, но и лабораторно оценить инфекционный статус из-за кросс-реактивности АТ к флавивирусам между собой, которая с течением времени только усиливается. Крайне важно дифференцировать острое течение лихорадки Зика от лихорадки денге в анамнезе в связи с опасностью ли-

хорадки Зика для беременных женщин, а также неврологическими последствиями заболевания [8, 14, 19, 21, 27]. Для флавивирусных инфекций проведение дифференциальной лабораторной диагностики важно также для прогноза развития инфекционного процесса [6]. Предполагается, что присутствие перекрестно-реактивных антител, появившихся в результате предшествующих контактов с гетерологичными флавивирусами, во время последующего инфицирования способствует развитию тяжёлых форм заболевания [8, 19, 21, 28]. Так называемый феномен антителозависимого усиления заболевания известен при вторичной лихорадке денге, а также при последовательном заражении ДЕНВ и ЗИКВ [8, 19, 28, 30].

В нашем исследовании в 16 (8,0%) образцах сывороток крови, обладающих АТ с высоким уровнем ИА к ДЕНВ, были обнаружены АТ с низким ИА к ЖЛВ и/или к ЗИКВ, что позволяет расценить их как кросс-реактивные или как свидетельствующие о бессимптомном течении, прежде всего, лихорадки Зика. Только анализ данных образцов в динамике позволил бы дифференцировать происхождение АТ с низким ИА. Однако оба варианта являются фактором риска для последующего инфицирования гетерологичным флавивирусом, циркулирующим на территории Никарагуа.

Заключение

Проведённое исследование подтвердило распространённость на территории Никарагуа лихорадок Чикунгунья и денге.

Метод анализа авидности АТ к флавивирусным инфекциям, будучи достаточно простым и применимым в любой лаборатории, является информативным для эпидемиологического серологического мониторинга и получения реальной картины распространения флавивирусов при их одновременном циркулировании.

Применение метода анализа авидности специфических АТ позволило подтвердить инфицирование ЧИКВ и ДЕНВ в прошлом, а также дифференцировать АТ с высокой авидностью к ДЕНВ, что свидетельствует об инфицировании в анамнезе, от АТ к ЖЛВ и ЗИКВ с низкой авидностью, которые, вероятно, являются проявлением феномена кросс-реактивности. Таким образом, метод анализа авидности может быть вспомогательным для дифференциальной клинической диагностики и для прогнозирования течения инфекционного процесса.

Информативность и простота исполнения метода анализа авидности специфических АТ, тем не менее, требует его стандартизации для широкого внедрения в практику не только в странах с одновременной циркуляцией нескольких флавивирусов. Необходимо также учитывать распространённый туризм в страны Центральной и Южной Америки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
2. Petersen L.R., Jamieson D.J., Powers A.M., Honein M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(16): 1552–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
3. Staples J.E., Breiman R.F., Powers A.M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(6): 942–48. <https://doi.org/10.1086/605496>
4. Barreto F.K.A., Alencar C.H., Araújo F.M.C., Oliveira R.M.A.B., Cavalcante J.W., Lemos D.R.Q., et al. Seroprevalence, spatial dispersion and factors associated with flavivirus and chikungunya infection in a risk area: a population-based seroprevalence study in Brazil. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 881. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05611-5>
5. Beatty M.E., Beutels P., Meltzer M.I., Shepard D.S., Hombach J., Hutubessy R., et al. Health economics of dengue: a systematic literature review and expert panel's assessment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84(3): 473–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0521>
6. Fritzell C., Rousset D., Adde A., Kazanji M., Van Kerkhove M.D., Flamand C. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(7): e0006533. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006533>
7. Sirohi D., Chen Z., Sun L., Klose T., Pierson T.C., Rossmann M.G., Kuhn R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016; 352(6284): 467–70. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
8. Stettler K., Beltramello M., Espinosa D.A., Graham V., Cassotta A., Bianchi S., et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301): 823–6. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>
9. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.J., Ballesteros G., Tellez Y., Soda K.J., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and Dengue virus. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(12): 1584–90. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
10. Elton N.W. Progress of sylvan yellow fever wave in Central America; Nicaragua and Honduras. *Am. J. Public Health Nations Health*. 1952; 42(12): 1527–34. <https://doi.org/10.2105/ajph.42.12.1527>
11. Elton N.W. Public health aspects of the campaign against yellow fever in Central America. *Am. J. Public Health Nations Health*. 1952; 42(2): 170–4. <https://doi.org/10.2105/ajph.42.2.170>
12. Anfasa F., Lim S.M., Fekken S., Wever R., Osterhaus A.D.M.E., Martina B.E.E. Characterization of antibody response in patients with acute and chronic chikungunya virus disease. *J. Clin. Virol.* 2019; 117: 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.06.001>
13. Kuan G., Ramirez S., Gresh L., Ojeda S., Melendez M., Sanchez N., et al. Seroprevalence of anti-chikungunya virus antibodies in children and adults in Managua, Nicaragua, after the first chikungunya epidemic, 2014–2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6): e0004773. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004773>
14. Rönnerberg B., Gustafsson Å., Vapalahti O., Emmerich P., Lundkvist Å., Schmidt-Chanasit J., et al. Compensating for cross-reactions using avidity and computation in a suspension multiplex immunoassay for serotyping of Zika versus other flavivirus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 2017; 206(5): 383–401. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0517-y>
15. Monath T.P. *The Arboviruses: Ecology and Epidemiology. Yellow Fever, vol. V.* Boca Raton: CRC Press; 1988: 139–231.
16. Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D.J., Kuno G., eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: CAB International; 1997: 1–22.
17. Harris E., Videa E., Pérez L., Sandoval E., Téllez Y., Pérez M.L., et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63(1-2): 5–11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.5>
18. Kouri G., Valdéz M., Arguello L., Guzmán M.G., Valdés L., Soler M., et al. Dengue epidemic in Nicaragua, 1985. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1991; 33(5): 365–71. (in Spanish)
19. Furuya A.K.M., Hunt D., George K.S., Dupuis A.P., Kramer L.D., Shi P.Y., et al. Use of the immunoglobulin G avidity assay to differentiate between recent Zika and past dengue virus infections. *Clin. Sci. (Lond.)* 2019; 133(7): 859–67. <https://doi.org/10.1042/CS20180874>
20. Silva M.M.O., Tauro L.B., Kikuti M., Anjos R.O., Santos V.C., Gonçalves T.S.F., et al. Concomitant transmission of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Brazil: Clinical and epidemiological findings from surveillance for acute febrile illness. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 69(8): 1353–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1083>
21. Tsai W.Y., Youn H.H., Tyson J., Brites C., Tsai J.J., Pedroso C., et al. Use of urea wash ELISA to distinguish Zika and dengue virus infections. *Emerg. Inf. Dis.* 2018; 24(7): 1355–9. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171170>
22. Hazell S.L. Clinical utility of avidity assays. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2007; 1(4): 511–9. <https://doi.org/10.1517/17530059.1.4.511>
23. Lehtonen O.P., Meurman O.H. An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J. Virol. Methods*. 1982; 5(1): 1–10. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(82\)90091-x](https://doi.org/10.1016/0166-0934(82)90091-x)
24. Narita M., Matsuzono Y., Takekoshi Y., Yamada S., Itakura O., Kubota M., et al. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5(6): 799–803. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.799-803.1998>
25. Tuokko H. Detection of acute measles infections by indirect and mu-capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.* 1995; 45(3): 306–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450312>
26. Prince H.E., Lapé-Nixon M., Busch M.P., Tobler L.H., Foster G.A., Stramer S.L. Utilization of follow-up specimens from viremic blood donors to assess the value of West Nile virus immunoglobulin G avidity as an indicator of recent infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12(9): 1123–6. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.9.1123-1126.2005>
27. Amaro F., Sánchez-Seco M.P., Vázquez A., Alves M.J., Zé-Zé L., Luz M.T., et al. The Application and interpretation of IgG avidity and IgA ELISA tests to characterize Zika virus infections. *Viruses*. 2019; 11(2): 179. <https://doi.org/10.3390/v11020179>
28. Malafa S., Medits I., Aberle J.H., Aberle S.W., Haslwanter D., Tsouchnikas G., et al. Impact of flavivirus vaccine-induced immunity on primary Zika virus antibody response in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2): e0008034. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008034>
29. Parra B., Lizarazo J., Jiménez-Arango J.A., Zea-Vera A.F., González-Manrique G., Vargas J., et al. Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(16): 1513–23. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1605564>
30. Halstead S.B. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.aid-0022-2014>

Информация об авторах

Отрашевская Елена Викторовна — главный специалист отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Казакова Елена Владимировна — зам. директора по управлению персоналом и организационному проектированию СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Жиренкина Екатерина Николаевна — к.м.н., зам. директора по научной работе СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>

Трухин Виктор Павлович — к.ю.н., директор СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Игнатьев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., проф., рук. кафедры иммунобиотехнологии СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, marburgman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 07.09.2021;
принята к публикации 04.04.2022;
опубликована 30.04.2022

Information about the authors

Alena V. Atrasheuskaya — senior specialist of R&D department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Elena V. Kazakova — Head HR and organizational designer, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Ekaterina N. Zhirenkina — Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for science, Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0810-5985>

Victor P. Trukhin — Director, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of immunobiotechnology, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia, marburgman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 07.09.2021;
accepted for publication 04.04.2022;
published 30.04.2022