

9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*. 2008, 26(8):1011-1024.
10. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y. et al. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*. 2000, 18:1952-1961.
11. Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular Cloning*, 2001.
12. Stanislavsky E.S., Joo I., Mashilova G.M. et al. Vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection: 1. Experimental studies. *Vaccine*. 1985, Jun 3(2):128-36.
13. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, complete genome. GenBank, Accession Number AE004091.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.И.Михайлов¹, Е.Ю.Малинникова¹, К.К.Кюрегян¹, И.А.Потемкин¹, Н.Д.Алсалих², О.В.Исаева¹, А.А.Карлсен¹, В.С.Кичатова¹, А.Д.Поляков³

ПАРАДОКС БАЛАЯНА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российский университет дружбы народов, Москва; ³Управление Роспотребнадзора по Белгородской области

В статье представлены результаты изучения эпидемиологии гепатита Е на территории Российской Федерации. Получены данные, объясняющие феномен, известный как парадокс Балаяна — широкое распространение анamnестических тел к вирусу гепатита Е при отсутствии регистрируемой заболеваемости. Показано, что завозные случаи инфекции не в состоянии поддержать эпидемиологический процесс гепатита Е на территории России. Большинство случаев ВГЕ-инфекции имеют автохтонный характер и связаны с зоонозной передачей вируса 3 генотипа от свиней.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 80—85

Ключевые слова: гепатит Е, вирус гепатита Е, антитела, пути передачи, зооноз

M.I.Mikhailov¹, E.Yu.Malinnikova¹, K.K.Kyuregyan¹, I.A.Potemkin¹, N.D.Alsalikh², O.V.Isaeva¹, A.A.Karlsen¹, V.S.Kichatova¹, A.D.Polyakov³

BALAYAN PARADOX

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian University of People Friendship, Moscow; Administration of the Rospotrebnadzor of Belgorod region

This article presents the results of a study of the epidemiology of hepatitis E in the Russian Federation. Obtained data explaining the phenomenon, known as the Balayan paradox — the wide distribution of anamnestic antibodies to the hepatitis E virus in the absence of a registered incidence. It was shown that imported cases of infection are not able to support the epidemiological process of hepatitis E in Russia. The most cases of HEV infection are autochthonous in nature and are associated with zoonotic transmission of genotype 3 virus from pigs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 80—85

Key words: hepatitis E, hepatitis E virus, antibodies, transmission, zoonosis

ВВЕДЕНИЕ

Столетний юбилей Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова послужил поводом к подведению итогов и разработке новых направлений дальнейших исследований. Лаборатория вирусных гепатитов — одна из самых молодых в институте. Она была организована всего два с половиной года тому назад сотрудниками, перешедшими из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, из лаборатории, которую ранее возглавлял академик РАМН М.С. Балаян, первооткрыватель вируса гепатита Е (ВГЕ) [9]. Это определило основное направление ис-

следований лаборатории — изучение вирусных гепатитов с энтеральным механизмом передачи, гепатитов А (ГА) и Е (ГЕ).

Открытие ВГЕ в результате опыта по самозаражению, который провел М.С. Балаян, а также описание крупных вспышек в Юго-восточной Азии привлекли пристальное внимание к этой инфекции. По оценке ВОЗ, в настоящее время ВГЕ ежегодно вызывает около 3 млн случаев острой, клинически выраженной инфекции, из которых около 44 тысяч заканчивается летально [11]. Высокая спорадическая и вспышечная заболеваемость ГЕ в странах с жарким климатом, значительная летальность среди беременных женщин определили значимость гепатита Е прежде всего как региональной инфекции. Ситуация изменилась, когда появились данные о частоте обнаружения антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) среди здорового населения неэндемичных по ГЕ регионов мира. Кроме того, обнаружение случаев хронического гепатита Е у лиц с ослабленным иммунитетом и выявление поражения нервной системы, связанного с непосредственным действием ВГЕ, повысило интерес к инфекции как общемировой проблеме здравоохранения.

М.С. Балаян обратил внимание на следующее явление, характерное для ГЕ в странах с умеренным климатом — значительный процент выявления анти-ВГЕ, свидетельствующих о встрече с вирусом здорового населения, при практически полном отсутствии регистрируемых случаев ГЕ. Это положение было определено как парадокс Балаяна.

Цель работы — представить полученные нами данные, необходимые для объяснения парадокса Балаяна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе проведения исследований проведено тестирование сывороток крови, собранных от условно здорового населения, проживающего в различных регионах страны: 6 регионов РФ (n=6238) — Московской, Ростовской, Свердловской областей, Хабаровского края, Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва. В исследовании были представлены все возрастные группы — менее 1 года, 1–4 года, 5–9 лет, 10–14 лет, 15–19 лет, 20–29 лет, 30–39 лет, 40–49 лет, 50–59 лет и старше 60 лет, каждая возрастная группа включала примерно 100 человек в каждом регионе. Кроме того, исследованы следующие группы: условно здоровое взрослое население Белгородской области (n=2482 человека); трудовые мигранты, недавно прибывшие в РФ из Узбекистана (n=464), Таджикистана (n=415), Украины (n=308) и Молдовы (n=146) и проходившие обследование в Центре гигиены и эпидемиологии Московской области. Кроме того, исследованы сыворотки крови от 181 больного острым гепатитом Е, проживающего в Московской, Владимирской, Белгородской области и г. Санкт-Петербург.

От всех участников исследования были получены информированное согласие и анкеты, отражающие демографические данные и сведения о перенесенных заболеваниях печени, а также факторах риска инфицирования энтеральными и парентеральными гепатитами.

Во всех образцах сыворотки крови определяли анти-ВГЕ IgG и IgM методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M») согласно инструкции производителя. РНК ВГЕ определяли в образцах, положительных по анти-ВГЕ IgM, методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку генома ВГЕ, кодирующему капсидный белок. На наличие РНК ВГЕ тестировали свиные фекалии от 1389 животных в возрастном интервале от 0 до 12 месяцев, собранные на 17 свинофермах во Владимирской, Свердловской, Саратовской, Калининградской, Архангельской областях и Хабаровском крае.

Определение нуклеотидной последовательности ВГЕ проводили методом прямого секвенирования ампликонов. Продукты ПЦР, соответствующие фрагменту-мишени, выделяли из агарозы с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). Для определения последовательности фрагментов использовали автоматический секвенатор SEQ8800 (Beckman Coulter). Секвенирование осуществляли с использованием набора GenomeLab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle

Sequencing (“Beckman Coulter”, США), основанного на использовании флюоресцентных меток, связанных с ddNTP (Dye Terminators), согласно протоколу производителя.

Секвенирование каждого ПЦР-фрагмента проводили в двух направлениях — с прямым и обратным праймером. Полученные хроматограммы были собраны в готовые последовательности при помощи модуля Seqman 4.03 (пакет программ LASERGENE, DNASTAR, США). Выравнивание и филогенетический анализ последовательностей ВГЕ проводили с помощью программы Mega 5.0.

Анализ заболеваемости ГЕ проводили по материалам официальных статистических данных об инфекционной заболеваемости в Российской Федерации (форма №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»), публикуемых Роспотребнадзором.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы EXCEL 2003 и программы статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Для оценки достоверности различий значений показателей в сравниваемых группах с использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($p < 0,05$)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О наличии перенесенной ВГЕ-инфекции свидетельствуют анти-ВГЕ IgG, которые, в отличие гепатита А, циркулируют менее продолжительное время [2]. Сведения о частоте выявления маркеров инфицирования ВГЕ в России до начала наших исследований носили ограниченный характер, поскольку исследователи ограничивались определением анти-ВГЕ в отдельных группах населения нескольких регионов страны [1,3]. В связи с этим, для изучения интенсивности циркуляции ВГЕ в РФ необходимо определить частоту выявления анти-ВГЕ в представительных выборках условно здорового населения географически удаленных друг от друга регионов. Для решения данной задачи проводили определение анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения 6 регионов РФ — Московской, Ростовской, Свердловской областей, Хабаровского края, Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва.

Общая частота выявления анти-ВГЕ IgG среди обследованного условно здорового населения РФ составила 4,1% (258/6292). Наиболее часто анти-ВГЕ выявляли среди населения Московской области (7,5%), этот показатель достоверно превышал частоту выявления анти-ВГЕ в трех регионах — Свердловской области, Республике Саха (Якутия) и Хабаровском крае (2,6; 2,1 и 2,2%, соответственно, $p < 0,05$, критерий Фишера).

При тестировании 2482 человек, проживающих в Белгородской области, анти-ВГЕ IgG обнаружены в 13,42 % случаев, что также свидетельствовало о довольно интенсивной циркуляции вируса среди населения этого региона России.

Анализ частоты выявления анти-ВГЕ IgG в разных возрастных группах условно здорового населения продемонстрировал резкое увеличение этого показателя среди лиц старше 60 лет, при этом такая закономерность была отмечена во всех 6 обследованных регионах. В двух регионах — Московской и Ростовской областях, частота выявления анти-ВГЕ IgG была более 25% среди лиц старше 60 лет, достоверно превышая аналогичные показатели в остальных четырех регионах ($p < 0,05$), при этом в других возрастных группах — до 19 лет и 20-59 лет, статистически значимые различия по частоте выявления анти-ВГЕ во всех шести регионах отсутствовали.

Во всех изученных регионах частота выявления анти-ВГЕ IgG у лиц старше 60 лет в несколько раз превышает показатели, наблюдаемые в более молодых возрастных группах. Однако, несмотря на различия между регионами в показателях частоты выявления анти-ВГЕ, тенденция к значительному росту доли анти-ВГЕ позитивных лиц в группе старше 60 лет была абсолютно одинаковой.

В процессе выполнения исследования острый гепатит Е был диагностирован у 181 больного, проживающего в Московской, Владимирской, Белгородской области и г. Санкт-Петербурге [5]. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ, выделенных от пациентов, установил их принадлежность к 3 генотипу. Наиболее часто

ГЕ болели городские жители. Среди них преобладали мужчины в возрастных группах 50-59 и 60-69 лет. Об автохтонном характере заболевания свидетельствует то, что большинство пациентов до заболевания не выезжали за пределы региона проживания и не имели контактов с больными из других регионов.

В Российской Федерации в официальную статистическую форму регистрации (форма №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») острый гепатит E (ОГЕ) введен с 2013 года. В стране происходит постепенный рост регистрируемых случаев заболевания. В 2017 году ОГЕ был зарегистрирован в 25 регионах страны. Всего заболели 158 человек, что составило 0,11 на 100 тыс. Из заболевших 13 были дети в возрасте до 14 лет. Максимальные показатели заболеваемости зарегистрированы в Ивановской (27 заболевших/2,61 на 100 тыс. чел.), Владимирской (11 заб./0,78), Воронежской (20 заб./0,86) и Кировской областях (17 заб./1,31).

Полученные результаты свидетельствуют об относительно высокой частоте выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения во всех обследованных регионах при низкой регистрации случаев острого гепатита E. Анализ литературы свидетельствует, что подобная ситуация характерна не только для РФ, но и других стран с умеренным климатом [10]. Таким образом, данные сероэпидемиологических исследований подтверждают сохранение актуальности положений парадокса Балаяна.

Одним из важных вопросов, возникшим при изучении эпидемиологии ГЕ, является вопрос об источниках ВГЕ. Длительное время считалось, что передача вируса от человека к человеку протекает крайне редко. Особенно это положение применимо в отношении 3 и 4 генотипа ВГЕ. Групповые вспышки инфекции в регионах с умеренным климатом встречаются крайне редко. В течении всего времени изучения этой инфекции нами лишь однажды была зарегистрирована вспышка ГЕ (Ковров, 2010 г [6]). Кроме того, мы крайне редко регистрировали семейные очаги ОГЕ.

Первоначально объяснением возникновения заболеваний ГЕ на эндемичных территориях служил возможный завоз вируса лицами, заразившимися в южных регионах мира. Подтверждением такой возможности послужили данные, полученные совместно с Е.В. Эсауленко [8]. В конце декабря 2011 г. и в январе 2012 г. в клинические стационары Санкт-Петербурга поступили пациенты, прибывшие на учебу из Индии (г. Мумбай) в составе группы, превышающей 200 человек. У 13 из них был поставлен диагноз «острый гепатит E». Эта группа пациентов из Мумбая длительное время находилась у себя на родине в очаге инфекции, в результате чего в г. Санкт-Петербург прибыли лица, имевшие ГЕ на разных этапах инфекционного процесса. При дальнейшем наблюдении за очагом случаи передачи ВГЕ контактными лицам установлены не были.

Несмотря на интенсивное развитие туризма, число прибывающих лиц, инфицированных ВГЕ, не столь велико. В отличие от туристов, поток мигрантов, приезжающих в Россию из ближнего зарубежья, значителен. По данным Федеральной миграционной службы в настоящее время в России находятся свыше 10 миллионов иностранных граждан, из них граждан стран СНГ — около 8,7 миллиона человек.

Образцы сывороток крови, собранных от мигрантов, подвергли скринингу на присутствие антител к ВГЕ IgM и IgG. В среднем, 5,93% (79/1333) мигрантов были серопозитивными по анти-ВГЕ IgM, 25,36% (338/1333) были положительными по анти-ВГЕ IgG, и 3% (40/1333) имели одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG. Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявлялись среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана, по сравнению с мигрантами из Украины и Молдовы: 25,4% и 43,1%, соответственно, по сравнению с 7,8% и 12,3%, соответственно ($p < 0,01$). Наличие анти-ВГЕ IgM, указывающее на текущую или недавнюю инфекцию, было установлено среди мигрантов из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Молдовы с частотой 3,9%, 7,8%, 5,8% и 6,8%, соответственно. РНК ВГЕ не была обнаружена ни в одном из 79 образцов сыворотки крови, содержащем IgM или IgM и IgG. Исходя из полученных данных можно сделать заключение о том, что данная группа лиц потенциально может быть источником вируса, но реально не в состоянии поддержать эпидемиологический процесс ГЕ на территории России.

Открытие зоонозной природы ГЕ позволяет объяснить глобальную циркуляцию ВГЕ на территории страны. По общему мнению, несмотря на обнаружение ВГЕ у различных животных (свиньи, куры, олени, крысы, кролики и т.д.), основным резервуаром вируса служат свиньи. Тесный контакт человека со свиньями, употребление в пищу контаминированной ВГЕ свинины определяют ведущее место в распространении вируса в популяции людей. Подтверждением широкого распространения ВГЕ среди популяции свиней служат данные, полученные нами (работа выполнена совместно с С.А. Солониным). Были собраны фекалии от свиней в возрастном интервале 2-4 месяца в 6 географически отдаленных (более 1000 км) друг от друга регионов РФ — Владимирской, Свердловской, Саратовской, Калининградской, Архангельской областях и Хабаровском крае. Всего было обследовано 17 свиноферм, собрано 1389 образцов. Из 17 обследованных свиноферм только на 3 не было выявлено ни одного случая ВГЕ-инфекции у животных в возрасте 2-4 месяцев — на одной ферме в Хабаровском крае и двух фермах в Калининградской области. Результаты определения частоты выявления ВГЕ-инфекции у свиней в возрасте 2 — 4 месяцев показали значительные варьирования от региона к региону, от 60,5% во Владимирской области до 8,8% в Хабаровском крае [4].

Анализ сходства нуклеотидных последовательностей в участке ОРС 2 РНК ВГЕ, а также построение филогенетических деревьев для данного участка генома ВГЕ с достоверным филогенетическим группированием с использованием бутстрэп-анализа позволили установить, что все изоляты принадлежали к 3 генотипу ВГЕ, аналогичному генотипу вируса, циркулирующего среди людей на территории России. Кроме того, было показано, что выделяемые от заболевших людей и от свиней на одной территории (Белгородская область) геноизоляты ВГЕ очень близки между собой, что свидетельствует о возможной передаче вируса от свиней человеку [7].

Хорошо известно, что своевременно и грамотно поставленный вопрос в процессе изучения той или иной инфекции может быть чрезвычайно важен. При объяснении парадокса Балаяна были получены данные, необходимые для понимания эпидемиологии ГЕ. Несомненно, эпидемиология ГЕ сложнее, чем мы представляем в настоящее время. Остается не выясненной до конца возможная роль других животных (помимо свиней) в распространении вируса. Нет всеобъемлющего представления о передаче ВГЕ со сточными водами, контаминированным мясом и другими сельскохозяйственными продуктами (например, через контаминированные ВГЕ корнеплоды). Также нуждается в изучении характер заноса и распространения вариантов ВГЕ, не свойственных для той или иной территории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова Т.Н., Полянина А.В., Княгина О.Н. Характеристика гепатит Е-инфекции на территории с умеренным климатом. Медицинский альманах. 2010, 2:236-239.
2. Кюрегян К.К., Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю., Романенко В.В., Поляков А.Д., Михайлов М.И. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита Е. Клиническая лабораторная диагностика. 2018, 63(5): 310-314.
3. Кузьменко Е.В., Вахнина Л.Н. К вопросу о частоте обнаружения антител к вирусу гепатита Е у населения неэндемичных регионов на примере Магаданской области. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2004, 5: 67-68.
4. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов (монография). М., Икар, 2013.
5. Малинникова Е.Ю. Клинико-эпидемиологическая характеристика гепатита Е в Российской Федерации. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2014.
6. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.Е., Гордейчук И.В., Солонин С.А., Зайцев О.В., Заботина Е.Е., Манина Т.А., Лисицина Е.В., Душина И.Ф., Штурмина С.М., Краснов В.П., Груздев К.Н., Брызгалов С.П., Лисицин Е.А. Групповая заболеваемость гепатитом Е в г. Коврове Владимирской области (предварительное сообщение). Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. 2009, 26: 239.

7. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К. Молекулярная эпидемиология и диагностика гепатита Е. Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017, С. 68-69.
8. Эсауленко Е.В., Малинникова Е.Ю., Перадзе Х.Д., Яковлев А.А., Михайлов М.И. Спорадические и групповые завозные случаи гепатита Е в Санкт-Петербурге. Журн. микробиол. 2013, 1: 38-41.
9. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology. 1983, 20(1):23-31.
10. Capai L., Charrel R., Falchi A. Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps? Viruses. 2018 May 25;10(6). pii: E285. doi: 10.3390/v10060285.
11. WHO. Hepatitis E. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.Н.Носик¹, К.А.Рыжов¹, А.Б.Потапова²

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1 СУБТИПА А6 В ПРИСУТСТВИИ ГОРМОНОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ СОВРЕМЕННЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ КОНТРАЦЕПТИВОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Изучение влияния женских половых гормонов, входящих в состав контрацептивов, на репликацию ВИЧ-1 и эффективность действия антиретровирусных препаратов (АРТ-препараты). *Материалы и методы.* Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) доноров, стимулированные ФГА (2 мкг/мл), и лимфобластоидные клеточные линии MT-4 и Jurkat инфицировались ВИЧ-1 (субтип А6). Клетки культивировались в течение 6 дней в присутствии различных концентраций β-эстрадиола и прогестерона, без/или добавлением АРТ-препаратов ламивудина (ЗТС), этравирин (ЕТР) и индинавира (ИДВ). Мониторинг вирусной продукции осуществлялся путем количественного определения р24 в культуральной жидкости клеток на 6 день после инфицирования. Эксперименты ставились в 8 повторах. *Результаты.* Выявлено увеличение вирусной репликации в 1,3-1,8 раза в присутствии высоких концентраций обоих гормонов (26 мкг/мл, 136 мкг/мл). При культивировании инфицированных клеток одновременно в присутствии гормонов и АРТ-препаратов разного класса отмечено неполное подавление репродукции вируса. Средний показатель уровня подавления вирусной репликации для β-эстрадиола составил 77,3% и 69,8% для прогестерона. В отсутствии гормонов при добавлении АРТ-препаратов в той же самой концентрации (2,5 мкг/мл) наблюдалось полное подавление вирусной продукции. *Заключение.* Показано, что *in vitro* высокие концентрации стероидных гормонов усиливают репликацию ВИЧ-1 и, как следствие, снижают эффективность АРТ-препаратов. Учитывая это, женщинам, имеющим высокий риск инфицирования ВИЧ, целесообразно перед назначением гормональной контрацепции проводить мониторинг уровня гормонов, который меняется во время менструального цикла и беременности.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 85—90

Ключевые слова: ВИЧ-1 субтипа А6, женские половые гормоны, вирусная репликация, антиретровирусные препараты

М.Н.Носик¹, К.А.Рыжов¹, А.Б.Потапова²

REPLICATION OF HIV-1 SUBTYPE A6 IN THE PRESENCE OF HORMONES INCLUDED IN THE MODERN HORMONAL CONTRACEPTIVES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. To study how female hormones included in oral contraceptives (β-estradiol and progesteron) affect HIV-1 replication and efficacy of antiviral drugs. *Material and methods.* Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cell lines MT-4, Jurkat were infected with HIV-1 (subtype A6). Afterwards the cells