

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

ХОЛОДИЛОВ

Иван Сергеевич

ПЕРЕНОСИМЫЕ КЛЕЩАМИ ФЛАВИ- И ФЛАВИПОДОБНЫЕ
ВИРУСЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

1.5.10 – Вирусология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Карганова Галина Григорьевна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Общая характеристика флавивирусов.....	10
1.1.1 Систематическое положение флавивирусов	10
1.1.2 Строение вириона представителей рода Flavivirus	12
1.1.3 Жизненный цикл флавивирусов и строение генома.....	13
1.1.4 Распространение флавивирусов на территории России и их переносчики	16
1.1.5 Принципы районирования ареала вируса клещевого энцефалита.....	19
1.2 Общая характеристика флавиподобных вирусов.....	21
1.2.1 Систематическое положение флавиподобных вирусов	22
1.2.2 Общая характеристика сегментированных флавиподобных вирусов	22
1.2.3 Распространение флавиподобных вирусов в мире	24
1.2.4 Медицинское значение сегментированных флавиподобных вирусов	26
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Культуры клеток, животные и вирусы, использованные в работе.....	27
2.1.1 Культуры клеток	27
2.1.2 Лабораторные животные	28
2.1.3 Вирусы.....	28
2.2 Сбор полевого материала и работа с клещами.....	28
2.2.1 Сбор клещей	28
2.2.2 Получение клещевых суспензий	29
2.2.3 Заражение клещей из лабораторной культуры	29
2.3 Вирусологические, серологические и микробиологические методы	30
2.3.1 Изоляция вирусов на культурах клеток и в сосунках белых мышей.....	30
2.3.2 Концентрация вируса с помощью ультрацентрифугирования.....	31
2.3.3 Очистка вируса в градиенте плотности сахарозы.....	31
2.3.4 Просвечивающая электронная микроскопия	32
2.3.5 Выявление антигена ВКЭ методом ИФА	32
2.3.6 Получение колоний микроорганизмов из клещевых суспензий на плотной питательной среде	33
2.3.7 Изучение перекрестных реакций между ВКЭ и бактериями методом ИФА.....	34

2.4 Молекулярно-биологические методы, компьютерная обработка данных и электронная микроскопия.....	34
2.4.1 Выделение РНК.....	34
2.4.2 Обратная транскрипция.....	34
2.4.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)	35
2.4.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	35
2.4.5 Аналитический электрофорез в агарозном геле	36
2.4.6 Препаративный электрофорез и выделение ПЦР-фрагмента из агарозы	36
2.4.7 Секвенирование ДНК по Сэнгеру	36
2.4.8 Высокопроизводительное секвенирование	39
2.4.9 Филогенетический анализ	39
2.4.10 Статистическая обработка	40
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	41
3.1 Сравнение методов выявления вируса клещевого энцефалита в биологических материалах.....	41
3.1.1 Оценка специфичности ИФА и ПЦР-РВ для выявления ВКЭ по отношению к другим представителям рода <i>Flavivirus</i>	42
3.1.2 Влияние отклонений в пробоподготовке на чувствительность коммерческой тест-системы на основе ИФА при выявлении ВКЭ в клещах	43
3.1.3 Оценка возможных неспецифических реакций в ИФА с микроорганизмами, обитающими в клещах, при использовании коммерческой тест-системы	45
3.1.4 Обсуждение	47
3.2 Выявление и изоляция флави- и флавиподобных вирусов на границах ареала вируса клещевого энцефалита в России.....	49
3.2.1 Выбор регионов исследования	49
3.2.2 Республика Карелия.....	51
3.2.3 Калининградская область.....	58
3.2.4 Ставропольский край.....	61
3.2.5 Челябинская область.....	64
3.2.6 Республика Татарстан.....	69
3.2.7 Ульяновская область.....	71
3.2.8 Республика Тыва	74
3.2.9 Обсуждение	84
3.3 Общая характеристика выявленных флавиподобных вирусов.....	90

3.3.1 Вирус Алонгшан	90
3.3.2 Вирус Янгтоу	100
3.3.3 Обсуждение	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	109
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Информация о распространении известных природно-очаговых инфекций, а также выявление и характеристика новых потенциально опасных для человека инфекционных агентов является научной основой для обеспечения биологической безопасности, в том числе для составления краткосрочных и долгосрочных прогнозов, выработки мер по контролю заболеваемости, включая выбор стратегии и тактики профилактики.

Представители рода *Flavivirus* вызывают тяжелые заболевания у человека с поражением центральной нервной системы и геморрагическими лихорадками. Флавивирусы показали способность быстро распространяться на огромные территории [108], изменять вирулентность для человека [108, 243] и использовать альтернативные пути передачи [197].

В настоящее время на территории России отмечена циркуляция флавивирусов переносимых как комарами (вирус Западного Нила [25, 26, 58, 59], вирус японского энцефалита [13, 38] и вирус Ламми [55]), так и клещами (вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) [212], вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ) [82, 214], вирус Повассан [35, 36, 37, 174], вирус шотландского энцефаломиелита овец (ШЭО) [173]).

Наиболее значимые процессы эволюции арбовирусов можно ожидать на границах ареала и в зонах совместного обитания клещей разных родов и видов, где высока вероятность возникновения новых вариантов вируса в связи со сменой переносчиков и основных прокормителей. В связи с глобальным потеплением изменяется ареал переносчиков, что позволяет вирусам появляться на территориях, где их никогда не детектировали и не регистрировали вызываемую ими заболеваемость [86, 148, 221].

ВКЭ детектируют в более 20 видах клещей, но основными переносчиками считаются клещи *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*, чей ареал в последнее время существенно расширяется. Так клещи *I. persulcatus* были найдены около Полярного круга [158], а клещи *I. ricinus* – за Полярным кругом [221]. Вместе с расширением ареала основных векторов произошло и расширение ареала ВКЭ. Вирус был обнаружен в Скандинавских странах [86, 221], где его до недавнего времени не детектировали. Определение южной границы ВКЭ осложняется тем, что в степных районах основными обитателями являются клещи рода *Dermacentor*, способность которых в самостоятельном поддержании очагов клещевого энцефалита (КЭ) не до конца изучена.

В тоже время на распространение флавивирусов могут оказывать влияние и другие вирусы или микроорганизмы, циркулирующие в клещах. В Китае были выделены флавиподобные вирусы, которые отличаются от классических флавивирусов принципиально другим строением генома и представляют обособленную группу в семействе *Flaviviridae* [205]. Имеются данные о возможной патогенности этих вирусов для человека [151, 205]. Информация о распространении этих вирусов на территории России к началу данной работы полностью отсутствовала.

Степень разработанности темы

Изучение флавивирусов, циркулирующих на территории России, было начато в середине XX века, когда был открыт ВКЭ. Первые исследования были посвящены изучению распространения ВКЭ, переносчикам и заболеванию, вызываемому им. С появлением молекулярно-биологических методов исследования основные эпидемиологические работы перешли в область молекулярной эпидемиологии и эволюции вирусов. Мониторинг распространения социально значимых флавивирусов на территории России проводят учреждения Роспотребнадзора. Тем не менее, исследования изменчивости и характеристик вирусов на границах их ареала ограничены известными флавивирусами, циркулирующими на территории данной области. В связи с этим количество работ по выявлению флавивирусов на новых для него территориях ограничен. Работ по выявлению, изоляции и изучению биологических свойств флавиподобных вирусов на территории РФ до настоящего времени не проводилось.

Целью данной работы являлся поиск и характеристика переносимых клещами флави- и флавиподобных вирусов, циркулирующих на границе ареала вируса клещевого энцефалита на территории Российской Федерации.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Оценить специфичность и чувствительность методов выявления ВКЭ при исследовании биологического материала.
2. Создать современную карту распространения КЭ.
3. Исследовать членистоногих, собранных на территории России на границе ареала ВКЭ, на наличие РНК флави- и флавиподобных вирусов с использованием праймеров на род *Flavivirus* и специфичных праймеров для конкретных вирусов.

4. Оценить распространение и изучить специфику популяции ВКЭ на границах ареала.
5. Получить первичную генетическую и вирусологическую характеристики выявленных флави- и флавиподобных вирусов.

Научная новизна

В данной работе впервые:

1. Показаны возможные причины возникновения ложноположительных реакций при проведении иммуноферментного анализа (ИФА).
2. Выявлен и изолированы штаммы сегментированного флавиподобного вируса Алонгшан из клещей, и показано его широкое распространение на территории России.
3. Выявлен и изолирован штамм сегментированного флавиподобного вируса Янгтоу из клещей на территории РФ.
4. Показано существование сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусов на территории России.
5. Показано, что популяция вируса Алонгшан помимо географической привязанности, филогенетически разделяется на группы, соответствующие основному клещу-переносчику *I. ricinus* и *I. persulcatus*.
6. Показана способность сегментированных флавиподобных вирусов Алонгшан и Янгтоу длительно персистировать в культуре клеток клещей *Hyalomma anatolicum* (НАЕ/CTVM8) и *I. ricinus* (IRE/CTVM19), не вызывая цитопатического эффекта.
7. Получена информация о морфологии вирионов вируса Алонгшан.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получена новая информация об особенностях распространения и эволюции популяции ВКЭ на границах его ареала. Впервые выявлена циркуляция флавиподобных вирусов Алонгшан и Янгтоу на территории РФ, изучена морфология их вирионов, генетические особенности и способность к репродукции и хронической инфекции в клетках членистоногих. Таким образом, в работе представлены пилотные исследования биологических свойств новых арбовирусов с потенциальной патогенностью для человека.

Полученные данные позволили сделать вывод о большей эффективности и специфичности детекции ВКЭ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) по сравнению с ИФА. Данные о циркуляции флавиподобных вирусов, потенциально опасных для человека, и существование сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусных инфекций могут служить основой для коррекции профилактических и противоэпидемических мероприятий, и важны при оценке эффективности существующих и создании новых профилактических и лечебных препаратов. В GenBank были депонированы 21 последовательность генома ВКЭ, 38 – вируса Алонгшан и 1 – вируса Янгтоу.

Методология и методы исследования

В работе были использованы классические вирусологические методы и молекулярно-генетические методы, включая высокопроизводительное секвенирование (ВПС).

Положения, выносимые на защиту

1. Ложноположительные реакции в ИФА при исследовании клещей на антиген ВКЭ могут быть связаны с взаимодействием с другими флавивирусами и/или микроорганизмами, обитающими в клещах.
2. Разнообразие вариантов ВКЭ на границах ареала определяется наличием стабильных во времени локальных популяций и заносом вируса с других территорий. Локальные очаги КЭ на границах ареала отличаются по уровню заноса вируса.
3. На территории России в популяции клещей широко циркулируют флавиподобные вирусы.
4. Флавиподобные вирусы с сегментированным геномом способны размножаться и длительно персистировать в перевиваемых культурах клеток клещей.
5. На территории России существуют сочетанные очаги флави- и флавиподобных вирусов.
6. Филогенетическое группирование штаммов вируса Алонгшан подобно таковому для ВКЭ и определяется, видом основного переносчика и местом изоляции.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и выводов представленной работы подтверждаются большим объемом исследованных клещей, стандартными методиками и строгими условиями проведения опытов.

Результаты работы были представлены на 10 международных и отечественных конференциях: Международная научная конференция «Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами», посвященная 75 – летию открытия вируса клещевого энцефалита (Иркутск, 2012); Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); Российская научная конференция с международным участием «Актуальные проблемы клещевого энцефалита» (Москва, 2013); Международная конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке», памяти члена-корреспондента РАН Ю.С. Балашова (Санкт-Петербург, 2013); XII International Jena symposium on tick-borne disease (Weimar, 2013); XV Conference of Ukrainian scientific society of parasitologists (Chernovtsi, 2013); 8-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва, 2014); XIII International Jena symposium on tick-borne disease (Weimar, 2019); Workshop on Ticks and Tick-borne Zoonoses in Eurasia (Vienna, 2019); XIV International Jena symposium on tick-borne disease (Weimar, 2021).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 7 научных статей: 1 – в российском журнале, входящем в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК, 6 – в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографических базах – Web of Science, Scopus, PubMed).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 143 страницах и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, а также заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 249 источников. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 28 рисунками.

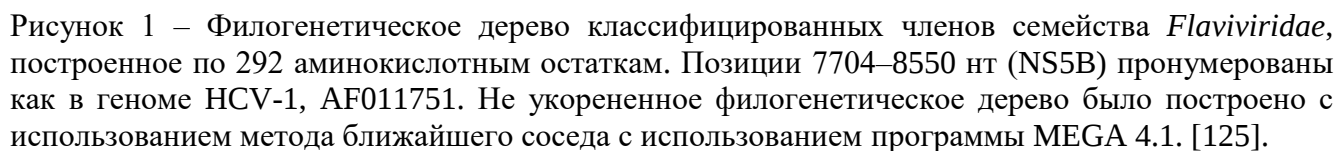
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика флавивирусов

1.1.1 Систематическое положение флавивирусов

Род *Flavivirus* совместно с родами *Pestivirus*, *Hepacivirus* и *Pegivirus* входит в состав семейства *Flaviviridae* (Рисунок 1). До недавнего времени семейство *Flaviviridae* объединяло оболочечные вирусы с несегментированным одноцепочечным положительным РНК-геномом (оц(+))РНК) [219].

Род *Flavivirus* включает более 53 видов [219]. Большинство флавивирусов передаются позвоночным хозяевам членистоногими-переносчиками, комарами или клещами, в которых они активно размножаются. Некоторые флавивирусы циркулируют между грызунами или летучими мышами без или с помощью неизвестных членистоногих-переносчиков [143]. Соответственно в роде *Flavivirus* выделяют группу вирусов, переносимых клещами (Рисунок 2 черный сектор), и группу, переносимую комарами (Рисунок 2 фиолетовый сектор), группу вирусов с неизвестным переносчиком (Рисунок 2 красный сектор), а также группу вирусов, специфичных для насекомых, которая состоит из самостоятельной обособленной монофилетической группы классических насекомо-специфичных вирусов (Рисунок 2 синий сектор) и подгруппы насекомо-специфичных вирусов связанных с двумя хозяевами, которая входит в группу, переносимых комарами арбовирусов (Рисунок 2 зеленый сектор) [98]. Помимо этого в семейство *Flaviviridae* входит несколько групп неклассифицированных вирусов [143, 219].



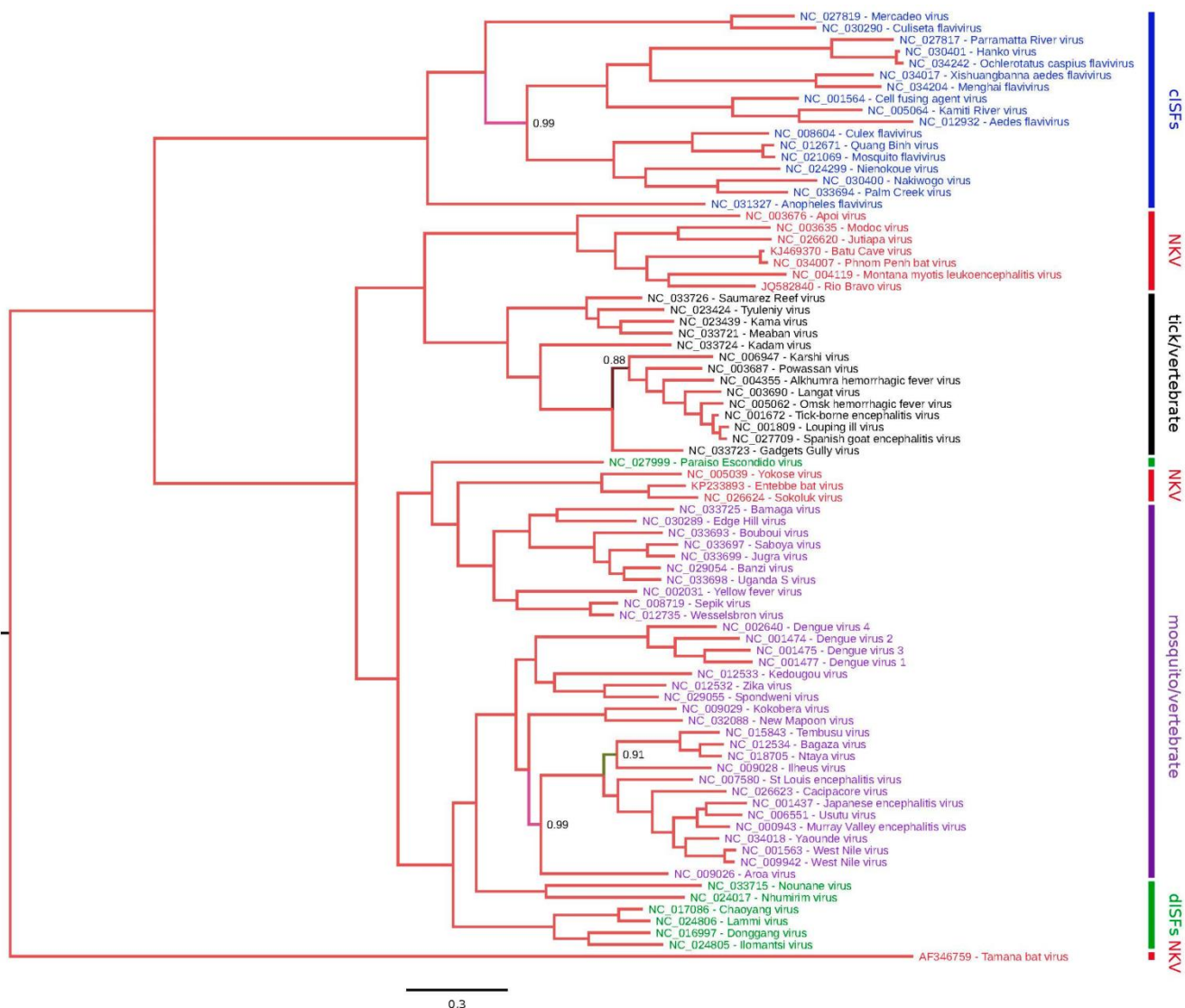


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево рода *Flavivirus* построенное по полным аминокислотным последовательностям полипротеинов с использованием метода ближайшего соседа [98].

1.1.2 Структура вириона представителей рода *Flavivirus*

Вирион представителей рода *Flavivirus* имеет сферическую форму около 500 Å в диаметре (Рисунок 3) [168, 194]. Белком С формируется нуклеокапсид вируса, который покрывает геномную РНК (гРНК) за исключением 5' и 3' концов. Нуклеокапсид покрыт липидной оболочкой, содержащей два вирусных белка: белок Е и белок М. В процессе репродукции флавивирусов образуются незрелые и зрелые формы вирионов (Рисунок 4, А) [128]. Зрелые вирионы содержат два кодируемых вирусом мембран-связанных белка, Е и М. Внутриклеточные незрелые вирионы содержат предшественник белка ргМ, который во время созревания клеточными протеазами расщепляется на полипептид рг и белок М [224]. Реконструкции изображений из криоэлектронных микрофотографий (Рисунок 4, Б) показали, что оболочка вириона имеет икосаэдрическую симметрию, в

которой серия из трех димеров белка Е выровнена «спина к спине», образуя расположение в виде «елочки», которое образует белковую оболочку вокруг липидного бислоя [194].

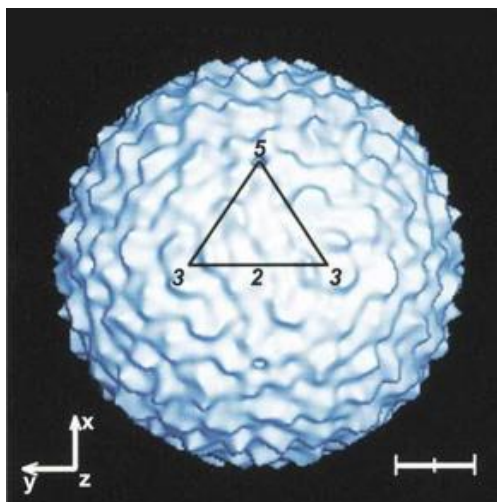


Рисунок 3 – Изображение вируса денге-2 с закрашенной поверхностью, полученное с помощью крио-ЭМ с разрешением 24 Å. Показан контур одной икосаэдрической асимметричной единицы и определение системы координат. Масштабная полоса соответствует 100 Å [168].

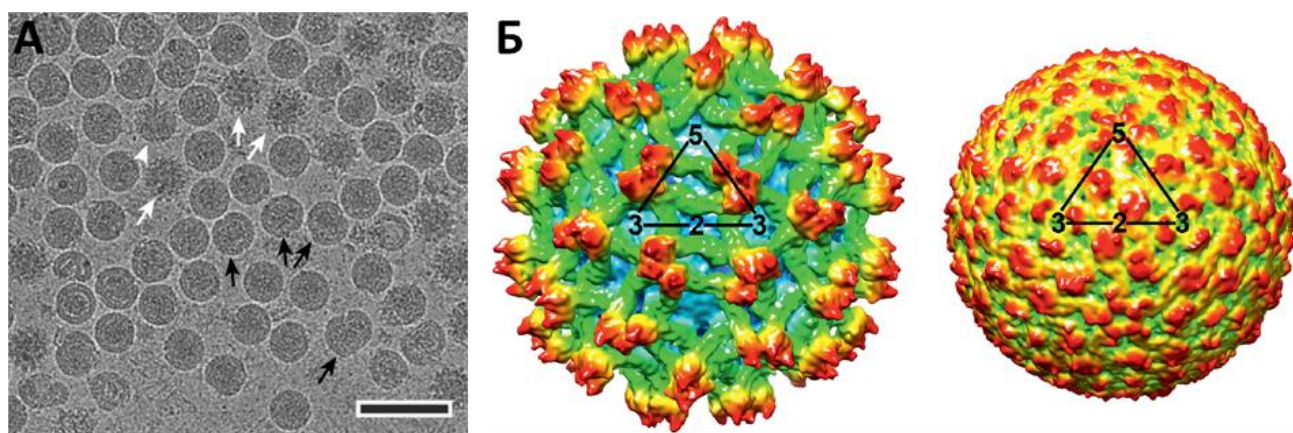


Рисунок 4 – А. Крио-ЭМ изображение вирионов ВКЭ. Образец содержал зрелые, незрелые (белые стрелки с хвостом), полужрелые (белые стрелки) и поврежденные (черные стрелки) частицы. Масштабная полоса соответствует 100 нм [128]. Б. Трехмерные криоэлектронные микроскопические реконструкции незрелых (слева) и зрелых (справа) частиц изолята вируса денге. Показано изображение поверхности незрелого вируса денге с разрешением 12,5 Å (слева) и зрелого вируса денге с разрешением 10 Å (справа). Треугольники очерчивают одну икосаэдрическую единицу [219].

1.1.3 Жизненный цикл флавивирусов и строение генома

Перед проникновением вируса в клетку на первом этапе происходит сорбция вируса на поверхность клетки и взаимодействие белка Е с поверхностными рецепторами. Для ВКЭ показано взаимодействие с гликопротеином 110 кДа [181],

интегрином $\alpha_3\beta_1$ и ламининсвязывающий белком [57] и белком 35 и 18 кДа [161]. Для вируса денге показано, что выбор рецепторов связан с видом клеток, так в клетках комаров вирус денге взаимодействует с белком теплового шока 70 (Hsp70), R80, R67 и белком массой 45 кДа, а в клетках млекопитающих с гепарансульфатами, Hsp90, CD14, GRP78/BiP и высокоаффинным рецептором ламинина 37/67 кДа [209] (Рисунок 5 – 1).

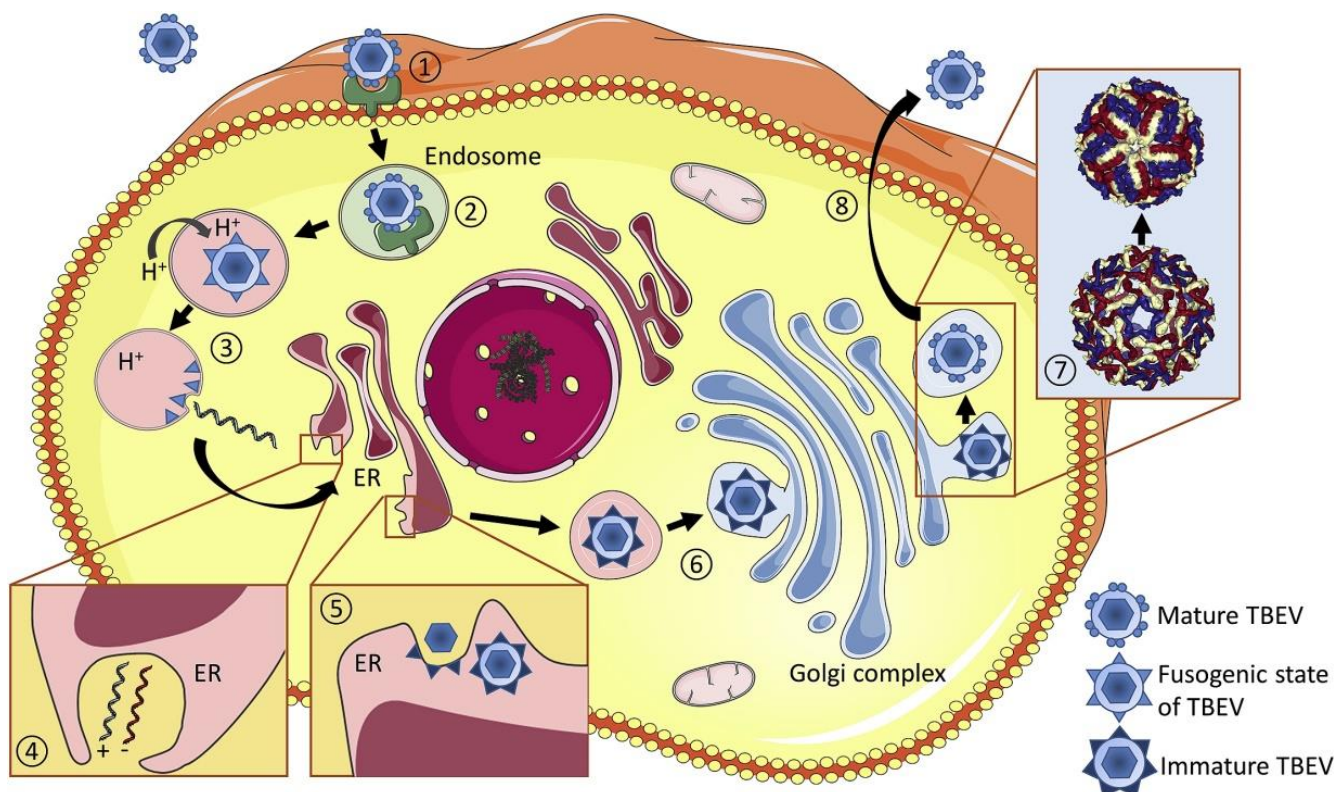


Рисунок 5 – Жизненный цикл флавивирусов на примере ВКЭ [212]. 1) Вирусные частицы связываются со специфическими рецепторами клетки. 2) Проникновение вирусной частицы в клетку с помощью эндоцитоза. 3) Низкий рН в поздних эндосомах приводит к конформационным изменениям белка Е с последующим слиянием оболочки вируса с мембраной эндосомы и высвобождением вирусной РНК. 4) Репликация вирусной РНК в структурах эндоплазматического ретикулума. 5) Выпочковывание нуклеокапсидов в просвет эндоплазматического ретикулума с приобретением липидной оболочки. 6) Незрелые вирионы проходят через комплекс Гольджи. 7) Транспорт и созревание вирионов путем расщепления ргМ и реорганизации белков Е в гомодимеры в цитоплазматических везикулах. 8) Высвобождение вирионов во внеклеточное пространство с помощью экзоцитоза.

Проникновение вирионов происходит за счет клатрин-зависимого эндоцитоза [110]. В тоже время описаны и альтернативные пути проникновения флавивирусов в клетку [83]. После эндоцитоза эндосома с вирусом превращается в позднюю эндосому за счет закисления (Рисунок 5 – 2). Низкие значения рН в поздних эндосомах приводят к конформационным перестройкам белка Е [138], при котором горизонтальный димер становится вертикальным тримером и высвобождается пептид слияния, который

экспонируется на белке E [225], обеспечивая слияние вирусной и эндосомальной оболочек и выход нуклеокапсида в цитоплазму клетки (Рисунок 5 – 3).

гРНК флавириусов представляет собой несегментированную оц(+)РНК длиной около 11000 нуклеотидов (нт) [130]. гРНК кодирует одну протяженную открытую рамку считывания, по краям которой находятся 5' и 3'- нетранслируемые области (НТО), длиной около 100 нт (5'-НТО) и 400-700 нт (3'-НТО). На 5' конце находится кэп 1-го типа. Эти участки совместно с кэпом позволяют факторам инициации трансляции распознать гРНК, привлечь малую субъединицу 40S рибосомы, распознать стартовый AUG-кодон, рекрутировать большую субъединицу 60S рибосомы и начать трансляцию [130]. В процессе трансляции образуется один большой полипротеин длиной чуть более 3000 аминокислот, который под действием вирусной и клеточных протеаз разрезается на 10 белков: 3 структурных (С, ргМ, Е) и 7 неструктурных (NS1, NS2а, NS2b, NS3, NS4а, NS4b, NS5) (Рисунок 6) [212].

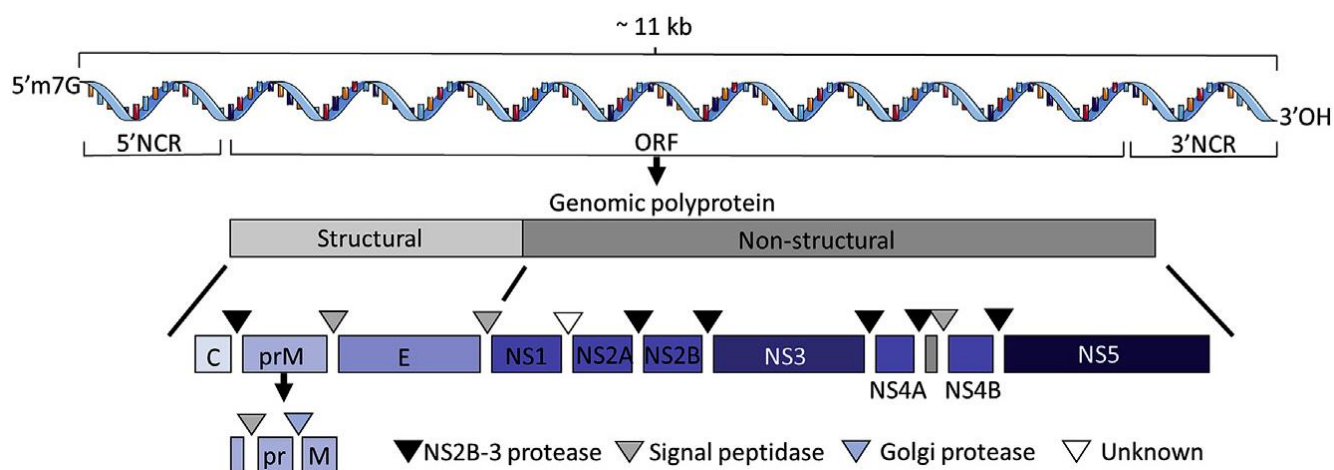


Рисунок 6 – Белки флавириусов и их процессинг [212].

Вирусной протеазой NS2b-NS3 и сигнальной пептидазой осуществляется процессинг C↓prM и NS4a↓NS4b, в результате чего получают К и 2К пептиды [172, 176]. За счет сигнальной пептидазы происходит процессинг prM↓E и E↓NS1, а за счет вирусного протеазного комплекса NS2b-NS3 – NS2a↓NS2b, NS2b↓NS3, NS3↓NS4a и NS4b↓NS5 [223].

Полученные при процессинге белки ргМ, Е и NS1 располагаются на внутренней стороне мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), белки С, NS3 и NS5 в цитоплазме, а NS2а NS2b NS4а NS4b являются трансмембранными [178]. После получения белков формируется репликативный комплекс, в состав которого входят NS1,

NS2A, NS3, NS4A, NS5 и некоторые клеточные белки [180, 227]. Синтез вирусной РНК происходит в мембранных структурах, связанных с ЭПР с образования (-)РНК, на основе которой синтезируется (+)РНК. После синтеза (+)РНК копируется при помощи вирусных ферментов NS3 и NS5 [178] (Рисунок 5 – 4). Сборка вирионов происходит во внутреннем пространстве ЭПР (Рисунок 5 – 5). Далее происходит транспорт вирионов в аппарат Гольджи (Рисунок 5 – 6) и их созревание в сети транс-Гольджи путем разрезания белка ргМ фурин-подобной протеазой (Рисунок 5 – 7) [138]. Высвобождение вирионов во внеклеточное пространство происходит с помощью экзоцитоза (Рисунок 5 – 8).

1.1.4 Распространение флавивирусов на территории России и их переносчики

На территории России отмечена циркуляция таких вирусов, входящих в род *Flavivirus*, как вирус Повассан [35, 36, 37, 174], вирус ОГЛ [27, 64, 82, 214], вирус ШЭО [173], вирус Западного Нила [1, 58, 59, 182], вирус японского энцефалита [54], вирус Ламми [55], ВКЭ [78, 117, 212].

1.1.4.1 Вирус Повассан (Powassan virus)

Впервые вирус Повассан был выделен 1958 году из мозга мальчика, умершего от энцефалита в г. Повассан, Северное Онтаро, Канада [187]. Циркуляция вируса отмечена только в трех странах: Канада [187], США [113, 120, 121] и в России на Дальнем Востоке [35, 36, 37, 113, 174]. Основными переносчиками вируса Повассан являются клещи *Ixodes cookei* [186, 242] и *I. scapularis* [100, 120, 229] в Северной Америке и *I. persulcatus* в России. Также вирус был выделен из клещей *Dermacentor andersoni* [232], *D. silvarum*, *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis japonica douglasii* [35, 37, 174] и различных млекопитающих [120]. Вирус вызывает тяжелые заболевания человека, подобные КЭ. На территории России заболеваемость низкая [36, 37].

1.1.4.2 Вирус омской геморрагической лихорадки

Первые случаи заболевания людей были зарегистрированы в конце первой половины XX века в лесостепных районах Омской области после эпизоотий завезенных в эту область ондатр. Установление этиологии заболевания и выделение вируса произошло в 1947 г. под руководством М.П. Чумакова. Ареал вируса ОГЛ ограничен лесостепями Западной Сибири и охватывает некоторые районы в Омской,

Новосибирской, Тюменской и Курганской областей [82, 214]. Основными переносчиками являются клещи *D. reticulatus* и *D. marginatus* [214]. Также вирус был выделен из клещей *I. persulcatus* [27] и комаров *Aedes excrucians*, *Mansonia richiardii* и *Ae. flavescens*. В последние десятилетия отмечается низкая заболеваемость с абсолютным доминированием нетрансмиссивного пути передачи [64].

1.1.4.3 Вирус шотландского энцефаломиелита овец (Louping ill virus)

Энцефаломиелит овец был известен в Шотландии с XVIII века. О том, что причиной этого заболевания является вирус, было установлено в начале 30-х годов XX века [133]. Основным местом распространения вируса ШЭО являются Великобритания, Ирландия [131], юго-запад Норвегии [129, 245], Дания [150] и северо-запад Испании [87, 184]. Также к группе ШЭО относят вирус турецкого энцефалита овец изолированного в Турции [132], вирус греческого козьего энцефалита – в Греции [202] и вирус Негиши, выделенный в Японии [236]. Основным переносчиком вируса ШЭО являются клещи *I. ricinus* [131, 149]. Вирус вызывает заболевание у крупного и мелкого рогатого скота, а также у человека. Описано более 40 случаев ШЭО у человека [149]. В России вирус ШЭО был выделен из клещей *I. persulcatus*, а также из крови и мозга заболевшего человека. Полученные штаммы были наиболее близки к штамму Негиши из Японии [173].

1.1.4.4 Вирус Западного Нила

Впервые выделен в 1937 году от пациента с лихорадкой в регионе Западный Нил, Уганда [220]. Следующее выделение вируса произошло спустя 13 лет из крови внешне здоровых детей в Египте [189]. В дальнейшем вирус выделяли от людей, из птиц, комаров и клещей. Вирус Западного Нила относится к группе вирусов, переносимых комарами. Основным переносчиком являются комары *Culex* sp., а резервуаром вируса являются птицы. Вирус распространен на всех континентах [102, 105, 107, 109, 136, 196, 200, 203, 208, 241]. На территории России вирус Западного Нила был выделен и была отмечена заболеваемость в Краснодарском крае, Ростовской, Астраханской и Волгоградской областях, Республике Крым, Курской, Липецкой, Воронежской областях, Ставропольском крае, Самарской области, Республике Калмыкия, Калужской, Курганской, Омской, Новосибирской, Томской областях, Алтайском крае, Красноярском крае, Еврейской автономной области и Приморском крае [1, 58, 59, 182].

1.1.4.5 Вирус японского энцефалита

Вирус японского энцефалита относится к группе вирусов, переносимых комарами. Первый подтвержденный случай японского энцефалита был зафиксирован в Японии в 1871 году [124]. В дальнейшем случаи заболевания регистрировались в Японии в начале XX века [206], в Корее, Китае, Филиппинах, Пакистане [124]. Эндемичными территориями являются страны Юго-Восточной Азии и государства, расположенные на западе Тихого океана от Кореи до Австралии, а также Ангола в Африке [126]. Также японский энцефалит был детектирован в птицах, пойманных в центральной части Италии [204]. Основными переносчиками являются комары *Culex* и *Aedes*, а основными резервуарами свиньи, болотные и водоплавающие птицы [126]. В России вирус встречается на территории Приморского края [54].

1.1.4.6 Вирус Ламми

Вирус Ламми входит в подгруппу насекомо-специфичных вирусов связанных с двумя хозяевами, которая входит в группу, переносимых комарами арбовирусов. Впервые вирус был выделен в Финляндии из пула комаров [141, 142]. Вирус успешно размножался в культуре клеток комаров C6/36, оказывая цитопатическое действие, и не размножался в культурах клеток млекопитающих [142]. В России вирус Ламми был выделен нами из комаров *Aedes cinereus*, пойманных в г. Санкт-Петербурге [55]. Не связан с заболеванием человека.

1.1.4.7 Вирус клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита впервые выделен в 1937 году на Дальнем Востоке во время экспедиции под руководством Зильбера Л.А.

На основании филогенетического анализа ВКЭ разделяется на три основных подтипа: европейский, сибирский и дальневосточный [122, 132]. Представители этих трех подтипов показали различия в географическом распространении, вирулентности, клинических проявлениях и различии в нуклеотидной (14,6–16,5%) и аминокислотной (5,0–6,8%) последовательностях их полипротеина [114]. На основании анализа степени гомологии участка гена, кодирующего белок Е (160 нт), были выделены 2 дополнительных генотипа, прототипными штаммами которых являются штаммы 178-79 и 886-84 [14, 22]. При исследовании гималайских сурков (*Marmota himalayana*) в Китае были выделены 2 штамма Himalaya-1 и Himalaya-2, которые образовывали отдельную

ветвь на филогенетическом дереве, и, по-видимому, являются отдельным подтипом ВКЭ [111]. Внутри каждого подтипа на основании филогенетического анализа выделяют отдельные группы. Так в сибирском подтипе выделяют 5 групп: Васильченко, Босния, Заусаев, обская, балтийская [233], также в европейском подтипе выделяют 3 группы, в сибирском – 3 группы, а в дальневосточном 4 группы [117]. На основании критерия о том, что штаммы, отличающиеся на менее чем 10% нуклеотидов в гене, кодирующим полный полипротеин, относятся к одному подтипу, штаммы ВКЭ были разделены на 7 подтипов: европейский, сибирский, дальневосточный, обской (TBEV-2871), гималайский, байкальский-1 (178-79), байкальский-2 (886-84) [115].

Общепризнано, что клещи *I. persulcatus* и *I. ricinus* являются основными переносчиками ВКЭ, и ареал вируса соответствует распространению этих клещей. Тем не менее, существуют территории, где отмечено обитание клещей этих видов, но не выявлена циркуляция вируса. Клещи *Ixodes pavlovsky* [191, 193] и *Haemaphysalis concinna* [75, 140, 160] также участвуют в циркуляции ВКЭ. Роль клещей рода *Dermacentor* в поддержании стойких очагов КЭ и их участие в инфицировании людей изучается [6, 8, 175]. Эндемичными по КЭ на территории России являются 48 субъектов [63, 78].

1.1.5 Принципы районирования ареала вируса клещевого энцефалита

Необходимость борьбы с КЭ и планирования профилактических и противоэпидемических мероприятий привело к необходимости районирования ареала ВКЭ. Ареал возбудителя – это все пространство земли, занятое природными очагами определенных болезней [32]. Позднее было уточнено, что ареалом возбудителя следует считать не все территории земного шара, где этот возбудитель когда-либо был обнаружен, а лишь те участки земли, в пределах которых осуществляется непрерывное воспроизведение возбудителя. Вся остальная территория, на которой встречался данный возбудитель, представляет собой участки выноса инфекции [15]. В тоже время ареал возбудителя арбовирусных инфекций совпадает или меньше ареала его основного переносчика.

Первые попытки районирования ареала ВКЭ были предприняты в конце 50-х годов XX века. Основой районирования послужила идея связи очагов заболеваний с природными или видоизмененными географическими ландшафтами. Авторы

сопоставили материалы по статистике заболеваний КЭ и данные по ареалу клеща *I. persulcatus* с учетом в его пределах физико-географических единиц разного объема и значения. Внутри зонального очага КЭ, который является совокупностью очагов в центре ареала таежного клеща, было выделено 4 внутризональных очага: Ленинградско-Вологодский, Удмуртско-Свердловский, Томско-Кемеровский, Хабаровско-Приморский [7]. Позднее данная работа была дополнена еще одним зональным очагом, который соответствовал ареалу клеща *I. ricinus* [30].

В 60-х годах XX века был проведен детальный картографический анализ многолетних данных о заболеваемости КЭ в различных административных районах РСФСР, который позволил выделить в пределах нозоареала КЭ участки с высокой и малой степенью интенсивности эпидемического проявления природных очагов [49].

В конце 60-х годов Окуловой Н.М. было выделено в пределах ареала возбудителей КЭ 6 областей по составу фауны иксодовых клещей [30]. Районирование ареала ВКЭ, проведенное Кучеруком В.В. с соавторами, разделило его на 18 очаговых регионов, объединенных в 4 группы: Европейская группа очаговых регионов лиственных и смешанных лесов, Сибирская группа очаговых регионов южнотаежных и среднетаежных лесов, Дальневосточная группа очаговых регионов хвойно-широколиственных и широколиственных лесов, Казахстано-Среднеазиатская группа очаговых регионов [33].

Изучение хорологической структуры вида основных переносчиков ВКЭ и ее сопоставление со структурой ареала вируса послужило основой для районирования ареала ВКЭ, предложенной Коренбергом Э.И. [28]. Ими были предложены таксономические единицы районирования: 1. природный очаг, 2. группа очагов, 3. класс очагов, 4. очаговый регион, 5. группа очаговых регионов, 6. ареал возбудителя (область распространения природных очагов). В соответствии с этим внутри ареала ВКЭ было выделено 69 очаговых регионов, которые были объединены в 7 групп: Центральноевропейская-Средиземноморская, Казахстанско-Среднеазиатская, Восточноевропейская, Западносибирская, Среднесибирская-Забайкальская, Хинганско-Приамурская, Притихоокеанская [30].

Все описанные выше принципы районирования основывались на ареале основных переносчиков ВКЭ – клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. В тоже время ареал ВКЭ немного шире ареала основных переносчиков. Как говорилось выше, на некоторых эндемичных

территориях, где отсутствуют клещи *I. persulcatus* и *I. ricinus* или их численность мала, роль основного переносчика выполняют *Ixodes pavlovskyi* [61, 207], *Haemaphysalis concinna* [11, 140], *Ixodes ovatus* [228], *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis flava*, *Ixodes nipponensis* [247]. Роль клещей рода *Dermacentor*, чья численность значительно возросла в последнее время, в поддержании циркуляции ВКЭ активно изучается [2, 3, 18, 48, 93, 95, 96, 97, 127, 153, 154, 155].

Было сделано много попыток связать свойства ВКЭ с местом циркуляции, однако четких данных получено не было. На основании эпидемиологических данных делается заключение о том, что есть значительные различия в клинических проявлениях у людей между подтипами вируса. Считается, что в Европе, где циркулирует европейский подтип ВКЭ, который связан с *I. ricinus*, заболеваемость КЭ ниже и регистрируется меньше тяжелых случаев, чем в местах, где циркуляция вируса связана с *I. persulcatus* [20, 21, 34, 99, 213].

1.2 Общая характеристика флавиподобных вирусов

В 1999 году Tettech с соавторами, изучая транскрипты личинок *Toxacara canis*, обнаружили 4 новых транскрипта, названных ant-3, ant-5, ant-30 и ant-34 (abundant novel transcript), которые не имели сходства с известными последовательностями и не были частью генома *Toxacara canis* [231]. В дальнейшем, Calister с соавторами показал, что ant-5 имеет отдаленное сходство с РНК-регуляторными белками, РНК-зависимой РНК-полимеразой, а ant-3, по-видимому, является бицистронным и кодирует две открытые рамки считывания (ant-3.1 и -3.2) [104]. В 2014 году китайскими учеными в пуле клещей *Rhipicephalus microplus* с помощью ВПС был детектирован новый флавиподобный вирус, названный Джингмен (Jingmen tick virus). Геном вируса состоял из 4 сегментов, три из которых имели гомологию с ранее описанными транскриптами (ant-5, ant-34 и ant-3.1) [205].

Благодаря достижениям в области ВПС и вирусной метагеномики в последние десятилетия было описано много новых флавиподобных вирусов [205, 218, 237], большинство которых было обнаружено или выделено из членистоногих [218]. Их способность вызывать инфекции и заболевания у позвоночных и их медицинское значение неизвестны.

1.2.1 Систематическое положение флавиподобных вирусов

Вирусы с сегментированным оц(+)РНК геномом, в структуре которых имеется гомология с РНК полимеразой и хеликазой флавивирусов [205], были включены в группу родственных, неклассифицированных вирусов (related, unclassified viruses) в семейство *Flaviviridae* [143]. В эту группу входят вирус Джингмен (Jingmen tick virus), а также недавно описанные вирус Алонгшан (Alongshan virus), вирус Янггоу (Yanggou tick virus) и другие, которые составляют группу Джингмен (Рисунок 7).

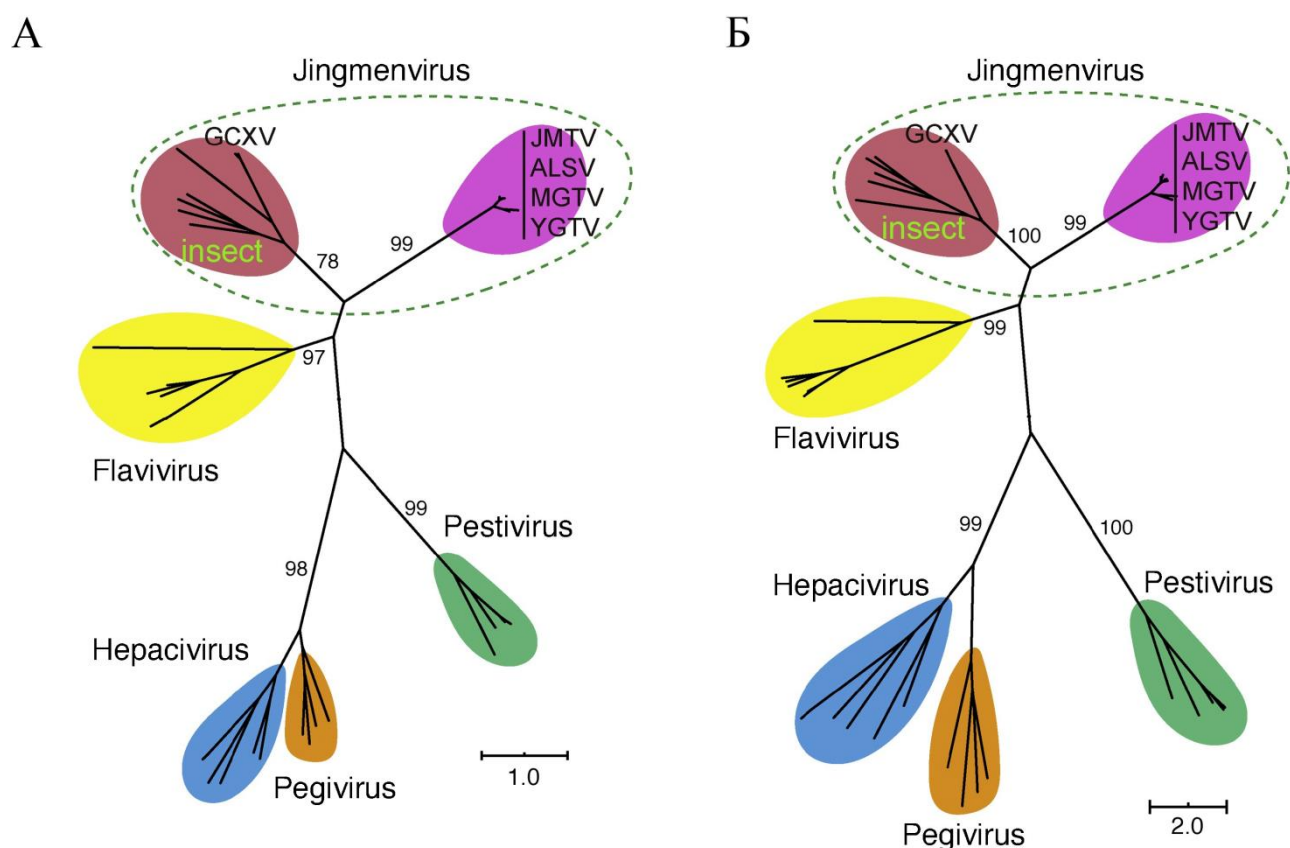


Рисунок 7 – Филогенетический анализ сегментированных и несегментированных флавивирусов [249]. **А.** Филогения NS3 сегментированных флавивирусов и других родов семейства *Flaviviridae*; **Б.** Филогения NS5 сегментированных флавивирусов и других родов семейства *Flaviviridae*.

1.2.2 Общая характеристика сегментированных флавиподобных вирусов

К началу данной работы не было данных о строении вирионов флавиподобных вирусов.

Вирион представителей сегментированных флавиподобных вирусов оболочечный и имеет сферическую или близкую к сферической форму. Диаметр вириона, по-видимому, зависит от вида вируса и культуры клеток, на которых проводили изоляцию,

и составляет от 30 – 35 нм у вируса Гвачо кулекс (*Guaico Culex virus*) до 70 – 100 нм у вирусов Джингмен и Алонгшан (Рисунок 8) [171, 205, 238]. Однако следует отметить, что в работах не предоставлены доказательства, что описанные вирусные частицы являются вирионами вируса Алонгшан.

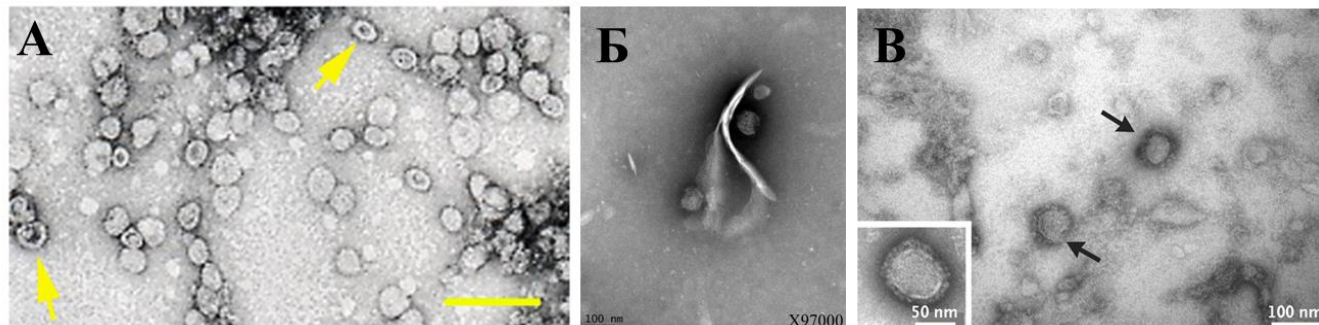


Рисунок 8 – А. Электронная микрофотография вирионов вируса Гвачо кулекс, полученного на культуре клеток C6/36 (*Aedes albopictus*) и очищенного в градиенте сахарозы, размер вириона 30 – 35 нм [171]. Б. Просвечивающая электронная микроскопия. Вирионы вируса Джингмен в культуральной жидкости клеток DH82 (макрофагоподобные клетки собаки), диаметр вириона 70 нм [205]. В. Электронная микрофотография вирионов вируса Алонгшан, полученного на культуре клеток Vero (эпителиальная культура клеток почки африканской зеленой мартышки) и очищенного в градиенте сахарозы, размер вириона 80 – 100 нм [238].

Геном сегментированных флавиподобных вирусов может включать от 4 до 5 сегментов [171, 205]. Флавиподобные вирусы, выделенные из клещей, имеют в своем составе 4 сегмента [205], в то время как вирусы, выделенные из комаров, – 4 или 5 сегментов [171, 218, 238].

Сегмент 1 кодирует неструктурный белок (NS5-like) у всех флавиподобных вирусов, который имеет гомологию с белком NS5 классических флавивирусов (Рисунок 9) [118, 205]. Был выявлен консервативный мотив, включающий FtsJ-подобный домен метилтрансферазы (pfam01728), содержащий 88 аминокислот. Этот мотив соответствует N-концу флавивирусного белка NS5 и участвует в кэпировании вирусной РНК [118].

Сегмент 2 кодирует предполагаемый гликопротеин VP1. Интересно, что у вируса Джингмен выделяют только один белок VP1, в то время как у вируса Алонгшан их два – VP1a и VP1b (Рисунок 9) [118, 159, 205]. Недавно нами и китайскими учеными независимо друг от друга была обнаружена еще одна открытая рамка считывания во втором сегменте флавиподобных вирусов [159, 249]. Эта рамка кодирует маленький белок, функция которого не известна. Белок имеет 3 трансмембранных домена. Эта открытая рамка считывания была найдена только у клещевых флавиподобных вирусов (Джингмен, Алонгшан и Янгтоу) [159, 249].

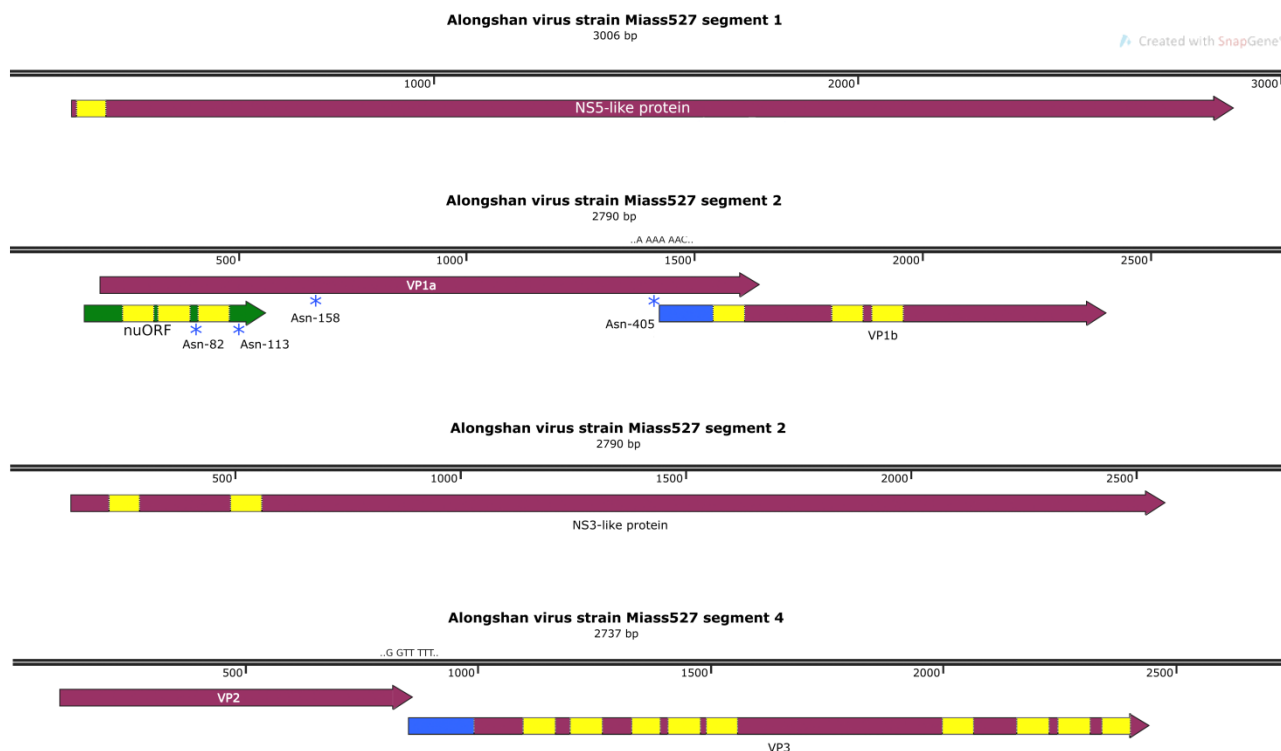


Рисунок 9 – Геном вируса Алонгшан, штамм Miass527 [159]. Трансмембранные области показаны желтым цветом, часть белка VP1b, полученная в результате предполагаемого рибосомного сдвига рамки считывания, показана синим, а предлагаемый новый белок в сегменте 2 – зеленым. Голубыми звездочками отмечены предполагаемые сайты N-гликозилирования.

Сегмент 3 – второй предполагаемый неструктурный белок (NS3-like), который имеет функциональное сходство с комплексом NS2b-NS3 флавивируса, играющим важную роль в процессинге вирусных полипротеинов и репликации генома [118, 205].

Сегмент 4 вирусного генома включает две открытые перекрывающиеся рамки считывания (Рисунок 9). VP2 представляет собой предполагаемый капсидный белок из 254 аминокислот с предсказанным сайтом расщепления сигнальной пептидазой, расположенным между остатками 19-20, и единственным сайтом N-гликозилирования, консервативным во всех штаммах. VP3 представляет собой предполагаемый вирусный мембранный белок [118].

Некоторые представители сегментированных флавиподобных вирусов, например, вирус Джингмен и Алонгшан, в отличие от классических флавивирусов имеют, поли(А) последовательности на 3'-НТО [205, 238].

1.2.3 Распространение флавиподобных вирусов в мире

К моменту начала данной работы (2014 год) было мало информации по распространению флавиподобных вирусов. Однако современные данные показывают,

что флавиподобные вирусы группы Джингмен широко распространены в мире. Они были детектированы практически на всех континентах (Рисунок 10): Евразия [69, 118, 123, 151, 169, 205, 218, 230], Африка [171, 230], Южная Америка [171, 185, 201, 230, 237] и Северная Америка [235].

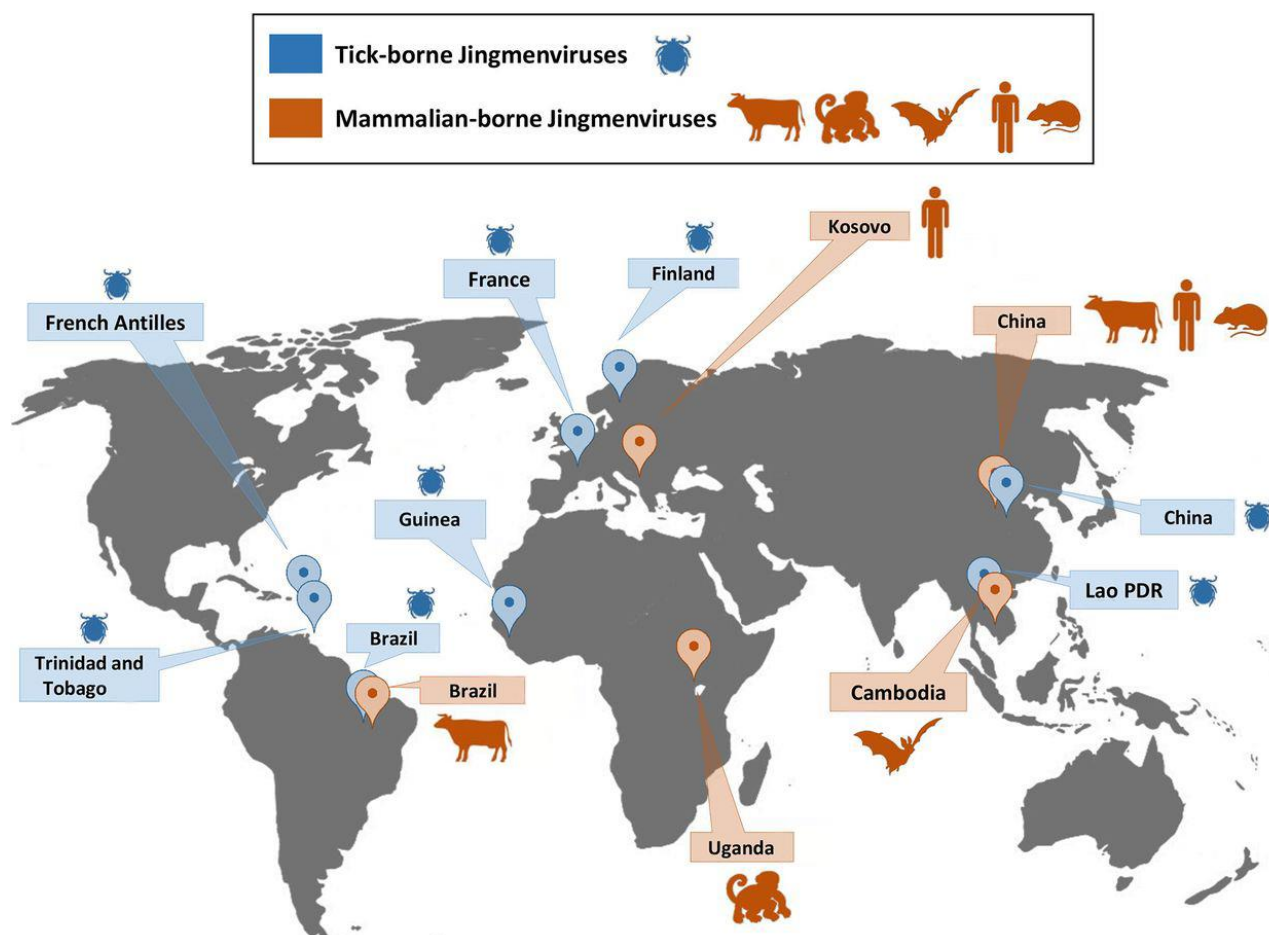


Рисунок 10 – Распространение вирусов группы Джингмен. Вирусы, детектированные в членистоногих – синий цвет, в млекопитающих – оранжевый цвет [230].

Представители группы Джингмен были детектированы в различных видах членистоногих, насекомых: *Drosophila melanogaster* [240] и комарах *Culex tritaeniorhynchus* и *Anopheles yatsushiroensis* [238], клещах: *Rhipicephalus microplus* [185, 201, 205, 215, 222, 230, 237], *Ixodes ricinus* [169, 230] *I. persulcatus* [151, 238], а также в млекопитающих [171, 185, 205, 222, 230, 235], включая человека [123, 151, 238].

Способность вируса репродуцироваться в различных системах определяет его опасность для окружающих. В большинстве случаев обнаружение вирусов группы Джингмен не приводило к выделению этих вирусов на культурах клеток, как членистоногих, так и млекопитающих, или в лабораторных животных. Вирус Джингмен, впервые обнаруженный в клещах *Rhipicephalus microplus* в Китае, детектировался в

культурах клеток C6/36 (клетки комаров *Aedes albopictus*) и DH82 (макрофагоподобные клетки собаки) только в течение 3 пассажей [205].

1.2.4 Медицинское значение сегментированных флавиподобных вирусов

К началу нашей работы данных об обнаружении сегментированных флавиподобных вирусов у млекопитающих не было. Позднее сегментированные флавиподобные вирусы были обнаружены в различных видах членистоногих и животных, однако, пока мало доказательств их значимости для здоровья человека.

Вирус Джингмен был обнаружен в крови приматов в Уганде [171], в крови крупного рогатого скота в Бразилии [185, 222] и в крови пациентов с диагнозом Крым-Конго геморрагической лихорадки в Косово [123] и России [69], что позволяет предположить, что сегментированные флавиподобные вирусы могут иметь потенциальное значение для общественного здравоохранения. Китайскими учеными было показано, что вирус Джингмен репродуцируется в биоптатах кожи человека в месте укуса клеща, а также ретроспективное исследование подтвердило 8 серологически положительных пациентов с тяжелыми клиническими симптомами и укусами клещей в анамнезе, что дало возможность предположить, что вирус Джингмен может быть патогенен для человека [151].

Вирус Алонгшан был выделен из крови пациента с лихорадкой на северо-востоке Китая [238]. У 86 из 384 пациентов с лихорадкой и укусами клещей в анамнезе был выявлен вирус Алонгшан с помощью молекулярных и серологических тестов. Пациенты, инфицированные вирусом Алонгшан, в анамнезе имели лихорадку, головную боль и другие симптомы, которые напоминают симптомы других клещевых заболеваний, таких как КЭ [238]. Эти результаты указывают на то, что сегментированные вирусы Джингмен и Алонгшан, могут быть причиной инфекционных заболеваний человека, и создавать угрозу для здоровья населения.

Двадцать одна последовательность вируса Янгтоу, полученная из клещей, собранных в Синьцзян-Уйгурском автономном районе Китая, были впервые депонированы в GenBank в июле 2018 года. Однако информация о характеристиках этого вируса до сих пор не опубликована.

На момент начала работы (2014 год) данных о циркуляции других флавивирусов или флавиподобных вирусов на территории России не было.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культуры клеток, животные и вирусы, использованные в работе

2.1.1 Культуры клеток

2.1.1.1 Культуры клеток клещей

Для изоляции флавиподобных вирусов были использованы перевиваемые культуры клеток клещей *Hyalomma anatolicum anatolicum* (НАЕ/CTVM8) и клещей *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM19), любезно предоставленных нам доктором Lesley Bell-Sakyi (Tick Cell Biobank, Pirbright Institute, Великобритания). Культивирование культур клеток клещей осуществлялось по методике, описанной ранее [89, 92]. Чистую культуру клеток клещей культивировали в пробирках со скошенным дном (Nunc) в термостате при 28°C (клетки IRE/CTVM19) или 32°C (клетки НАЕ/CTVM8). Каждую неделю в пробирках с культурой клеток заменяли половину объема среды (1,1 мл) на свежую поддерживающую среду. Поддерживающая среда для культивирования клеток на 10 мл: 7 мл среды L15 (Leibovitz) (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), 1 мл триптозо-фосфатного бульона, приготовленного согласно инструкции производителя (Difco, Детройт, Мичиган, США), 2 мл инактивированной (30 мин, 50 °C) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), 100 мкл 0,2М раствора L-глутамин (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»); 10 мкл антибиотика ципролет (Dr.Reddy's, Индия).

2.1.1.2 Культуры клеток млекопитающих

Для изоляции флавивирусов были использованы однодневные перевиваемые культуры клеток СПЭВ (почки эмбриона свиньи) и Vero (эпителиальная культура клеток почки африканской зеленой мартышки). Культивирование чистой культуры клеток проводила сотрудник лаборатории биологии арбовирусов Рогова Ю.В. Средой культивирования для культуры клеток СПЭВ являлась смесь среды 199 на растворе Хенкса и среды 199 на растворе Эрла (2:1) (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), для культуры клеток Vero – среда ДМЕМ, содержащая 5% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США); клетки культивировали при 37°C.

2.1.2 Лабораторные животные

Для изоляции флавивирусов использовали двудневных сосунков аутбредный мышей ICR («Столбовая», ФГБУН "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства"). Содержание лабораторных животных, ход эксперимента и последующая эвтаназия проводились в соответствии с заключением этического комитета ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумаков» №19 от 01.09.2016 г.

2.1.3 Вирусы

В работе использовали лабораторные штаммы из коллекции вирусов:

- вирус Лангат – штамм Tr-21 (GenBank: AF253419) [106];
- вирус омской геморрагической лихорадки – штамм Никитина (GenBank: GU290187) [68];
- вирус шотландского энцефаломиелита овец – штамм S1. Принадлежность к последнему вирусу установлена по результатам проведенного нами секвенирования фрагмента РНК длиной 250 нт, кодирующего участок белка NS5.
- ВКЭ – штамм ЭК-328 (GenBank: DQ486861) сибирского подтипа, первоначально выделенный из пула клещей *I. persulcatus* в 1972 году в Эстонии [210];
- ВКЭ – штамм Абсеттаров (GenBank: AF091005) европейского подтипа, выделенный от больного человека в Ленинградской области, где в основном встречается *I. ricinus* [167];
- ВКЭ – штамм Софьин КГГ (GenBank: GU121963) дальневосточного подтипа, выделенный из мозга больного человека в 1937 году [167];

Все работы с вирусами, а также с полевым материалом проводили в специально оборудованном помещении, сертифицированном для работы с патогенами II группы опасности.

2.2 Сбор полевого материала и работа с клещами

2.2.1 Сбор клещей

Сбор половозрелых форм клещей проводили двумя способами:

1. С помощью флага из вафельной ткани размером 100x80 см, прикрепленного к древку [47, 53]. Флаг осматривали каждые 5 – 10 м маршрута, при наличии клещей,

последних помещали в слегка увлажненные марлевые бинты. Клещей в бинтах хранили при +4°C до дальнейшего использования, но не более 2 недель. В дальнейшем клещей хранили при -70°C.

2. Сбор клещей с домашних животных и скота проводился вручную в стерильные пробирки. Клещей в пробирках хранили при +4°C до дальнейшего использования, но не более 2 недель. В дальнейшем клещей хранили при -70°C;

В работе были использованы клещи, собранные сотрудниками лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» в 2014 г. и 2015 г. в Челябинской области; в 2014 г. и 2017 г. в республике Тыва; в 2017 г. и 2018 г. в Калининградской области, а также совместно с сотрудниками Карельского научного центра РАН в республике Карелия в 2012 г., 2013 г., 2014 г., 2015 г. и 2018 г. Автор данной работы принимал активное участие в сборе иксодовых клещей.

Кроме того, были использованы клещи, собранные в Ставропольском крае, республике Татарстан и Ульяновской области сотрудниками ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» этих регионов.

Вид и пол собранных клещей был определен сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Беловой О.А. с использованием таксономических ключей [73, 74].

2.2.2 Получение клещевых суспензий

Клещей гомогенизировали индивидуально или пулами (по 3 – 5 особи) согласно видовому составу клещей, месту и маршруту сбора. Для гомогенизации клещей помещали в пробирки типа эппендорф с металлическим шариком и добавляли среду 199 на растворе Эрла (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») из расчета на каждого клеща *I. persulcatus* или *I. ricinus* – 150 мкл среды и на каждого клеща рода *Dermacentor* – 200 мкл. Гомогенизацию проводили с помощью гомогенизатора лабораторного TissueLyser II (QIAGEN, Германия) в течение 10 минут. После гомогенизации клещевую суспензию переносили в стерильную пробирку типа эппендорф, хранили при -70°C и использовали в дальнейших исследованиях.

2.2.3 Заражение клещей из лабораторной культуры

Заражение клещей проводила сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки

иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Белова О.А. по ранее описанной методике [94] штаммами ВКЭ Абсеттаров и ЭК-328. Титры вируса в клещевых суспензиях варьировались от 3 до 5 lg БОЕ/мл (БОЕ – бляшкообразующая единица – максимальное разведение вируса, способное вызвать образование одной негативной колонии – «бляшки» на монослойной культуре клеток под агаровым покрытием) [76].

2.3 Вирусологические, серологические и микробиологические методы

2.3.1 Изоляция вирусов на культурах клеток и в сосунках белых мышей

2.3.1.1 Изоляция вирусов на культурах клеток клещей

Для изоляции вируса на культурах клеток НАЕ/CTVM8 и IRE/CTVM19 200 мл вирусосодержащего материала (гомогенат клещей или культуральная жидкость (КЖ)) добавляли в пробирку с культурой клеток. Инкубация обеих зараженных культур клеток проходила при 28 °С. Один раз в 1 – 2 недели проводили замену поддерживающей среды путем удаления половины объема (1,1 мл) среды и добавления свежей поддерживающей среды.

2.3.1.2 Изоляция вирусов на культурах клеток млекопитающих

Клещевыми суспензиями, положительными на наличие РНК ВКЭ в ПЦР, заражали однодневные перевиваемые культуры клеток СПЭВ и Vero. В каждую лунку 24-луночной панели (cell culture plate 24 well, Costar) с культурой клеток вносили по 100 мкл клещевой суспензии и инкубировали 1 час при 37°С. После этого в каждую лунку добавляли по 1 мл поддерживающей среды, состоящей из среды 199 на растворе Эрла (для СПЭВ) или среды ДМЕМ (для Vero), 2% бычьей сыворотки (FBS, Gibco) и антибиотиков (100 U/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин), и инкубировали при 37°С. КЖ инфицированных клеток отбирали при возникновении цитопатического действия (ЦПД) или на 7 день после заражения культуры при отсутствии ЦПД.

2.3.1.3 Изоляция вирусов в сосунках аутобредных белых мышей ICR

Для изоляции вирусов интрацеребрально вводили 10 мкл вирусосодержащей жидкости. Наблюдение проводили в течение 14 дней. При возникновении симптомов заболевания сосунков умерщвляли и забирали головной мозг. При отсутствии симптомов, головной мозг отбирали на 6 и 14 сутки.

2.3.2 Концентрация вируса с помощью ультрацентрифугирования

Вирусодержащая КЖ, полученная при изоляции вирусов на культурах клеток, вносили в пробирки для ультрацентрифугирования (УЦФ). Осветление вирусодержащей КЖ перед УЦФ проводили при 10000об/мин в течение 30 минут с использованием ротора SW-28 в ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Бри, Калифорния, США). После осветления вирусодержащий супернатант переливали в другие пробирки для УЦФ. УЦФ проводили при 25000об/мин в течение 6 часов с использованием ротора SW-28 в ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Бри, Калифорния, США). После УЦФ надосадочную жидкость сливали в дезинфицирующий раствор, а пробирки с осадком помещали на фильтровальную бумагу в перевернутом состоянии для высушивания. После высушивания осадок растворяли в 200 мкл боратно-солевого буфера pH 9,0 (0,05 М H_3BO_4 , 0,12 М NaCl, 0,24 М NaOH) при +4°C в течение ночи с последующим замораживанием.

Полученный растворенный осадок в дальнейшем был использован для ВПС и просвечивающей электронной микроскопии.

2.3.3 Очистка вируса в градиенте плотности сахарозы

Для очистки вируса в градиенте плотности сахарозы готовили 15%, 30% и 60%-ные растворы сахарозы на боратно-солевом буфере pH 9,0 (0,05 М H_3BO_4 , 0,12 М NaCl, 0,24 М NaOH). Растворы сахарозы вносили аккуратно, избегая перемешивания, в ультрацентрифужную пробирку в соответствии с Рисунком 11. Пробирку заклеивали парафильмом и помещали на ровную поверхность на бок на 3 часа для создания градиента плотности сахарозы методом свободной диффузии.

По прошествии 3 часов на поверхность сахарозы аккуратно нанесли растворенный вирусодержащий осадок в количестве 500 мкл. УЦФ проводили с использованием ротора SW-40Ti в ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Бри, Калифорния, США) при 30000 об/мин в течение 4 часов.

После ультрацентрифугирования раствор сахарозы с вирусом аккуратно разливали по пробиркам типа эппендорф с помощью дозатора по направлению сверху до дна. Объем каждой фракции составлял 500 мкл.

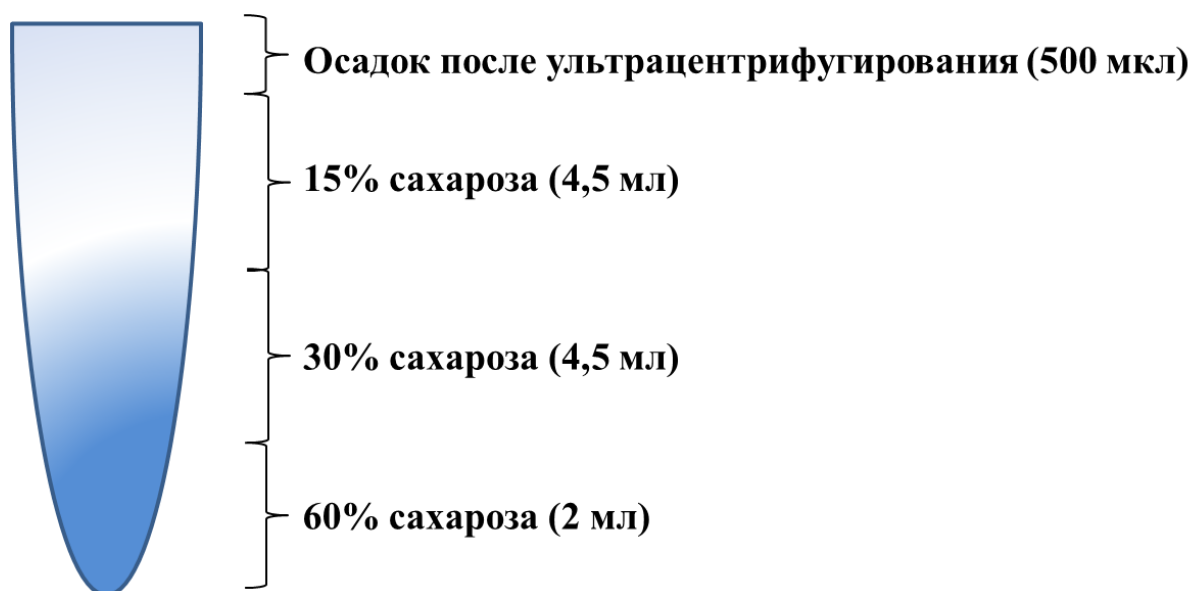


Рисунок 11 – Схема градиента плотности сахарозы для очистки вируса.

2.3.4 Просвечивающая электронная микроскопия

После очистки вируса, в градиенте плотности сахарозы, полученные фракции проверяли на наличие вируса Алонгшан с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров *Miass_gly_3F* и *Miass_gly_3R*. Фракция с наибольшим количеством вирусной РНК была использована для просвечивающей электронной микроскопии.

Образцы после ультрацентрифугирования адсорбировали на пленке Formvar, прикрепленной к никелевым сеткам для электронной микроскопии с размером ячейки 200-mesh и контрастировали 2% уранилацетатом [198]. Подготовленные образцы подвергались УФ-облучению в течение одного часа для инактивации вируса.

Просвечивающую электронную микроскопию проводил сотрудник Биологического факультета Московского Государственного Университета д.б.н. Никитин Н.А. на электронном микроскопе JEOL JEM-1400 (JEOL, Токио, Япония) при 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой камеры Olympus Quemesa с использованием программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Мюнстер, Германия).

2.3.5 Выявление антигена ВКЭ методом ИФА

ИФА проводили с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест») согласно инструкции производителя с описанными ниже изменениями пробоподготовки.

1. Экспериментально зараженные клещи из лабораторной культуры

- 1-й метод: клещей индивидуально суспензировали в 700 мкл среды 199 на растворе Эрла, и 100 мкл полученной суспензии (без добавления коммерческого раствора для разведения исследуемых образцов (РРИО)) вносили в лунки стрипов. Дальнейшее исследование проводили согласно инструкции производителя [76].
- 2-й метод: клещей индивидуально суспензировали в 100 мкл среды 199 на растворе Эрла, 50 мкл полученной суспензии смешивали с 50 мкл РРИО из набора, а затем 100 мкл вносили в лунки стрипов. Дальнейшее исследование проводили согласно инструкции производителя.
- 3-й метод: клещей индивидуально суспензировали в РРИО и исследовали индивидуально, строго следуя инструкции производителя.

2. Клещи из природной популяции

При суспензировании пула клещей среду 199 на растворе Эрла добавляли из расчета 100 мкл на одного клеща из пула, при индивидуальном суспензировании клещей – по 500 мкл среды 199 на растворе Эрла. Отбирали 50 мкл клещевой суспензии и добавляли 50 мкл РРИО из набора, 100 мкл полученной смеси вносили в лунку стрипа. Дальнейшее исследование проводили согласно инструкции производителя.

3. Определение чувствительности и специфичности ИФА с использованием вирусных суспензий с известным титром вируса.

К 50 мкл вирусной суспензии добавляли 50 мкл РРИО из набора, 100 мкл полученной смеси вносили в лунку стрипа для постановки ИФА. Дальнейший анализ проводили согласно инструкции производителя.

2.3.6 Получение колоний микроорганизмов из клещевых суспензий на плотной питательной среде

50 мкл клещевой суспензии, положительной в ИФА на наличие антигена ВКЭ, наносили на чашки Петри с колумбийским агаром, содержащим 5%-ную баранью кровь (BIO-RAD), и рассевали методом секторных посевов (по Голду–Родману). Чашки Петри помещали в CO₂ инкубатор на 24 часа. Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии [43]. Получение колоний микроорганизмов и их идентификацию с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии

проводила сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Мотузова О.В. на базе ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» [76].

2.3.7 Изучение перекрестных реакций между ВКЭ и бактериями методом ИФА

Чистую культуру микроорганизмов суспензировали в среде 199 на растворе Эрла. Бактериальные суспензии уравнивали по концентрации белка, определенной по методу Бредфорда [51]. Для постановки ИФА суспензии микроорганизмов разводили средой 199 на растворе Эрла до 3 и 6 мг/мл общего белка. К 50 мкл бактериальной суспензии добавляли 50 мкл РРИО из коммерческого набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»), 100 мкл полученной смеси вносили в лунку стрипа для постановки ИФА. В дальнейшем анализ перекрестных реакций проводили с помощью набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест») согласно прилагаемой к набору инструкции [76].

2.4 Молекулярно-биологические методы, компьютерная обработка данных и электронная микроскопия

2.4.1 Выделение РНК

Выделение вирусной РНК из клещевых суспензий и КЖ инфицированных клеток проводили тремя способами.

1. С помощью TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich) согласно протоколу производителя. Осадок РНК сушили в термостате при 37°C, растворяли в необходимом количестве тридистиллированной воды (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») и в дальнейшем использовали для обратной транскрипции.

2. Набором для выделения РНК QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Германия). Полученную РНК в дальнейшем использовали для обратной транскрипции.

3. С помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя.

2.4.2 Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили двумя способами:

1. Для реакции использовали случайный гексамерный праймер (R_6), обратную транскриптазу M-MLV и буфер к ней фирмы «Promega» (США). ОТ проводили согласно методике, прилагаемой к ферменту обратная транскриптаза M-MLV.

2. Реакция проводилась с помощью коммерческого набора для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя.

2.4.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Для проведения ПЦР-РВ использовали набор реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией АмплиСенс® TBEV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophillum, E.chaffeensis/ E.muris-FL (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя [76].

ПЦР-РВ проводилась на приборе Chromo 4 Real-Time PCR Detector фирмы BioRad.

2.4.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили на приборе DNAEngine фирмы BioRad с использованием Taq-полимеразы и праймеров (олигонуклеотидов), приведенных в Таблице 1. В начале работы поиск флавиподобных вирусов проводили с использованием праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 флавивирусов (панфлави) – cFD2 и MAMD [216]. После выявления флавиподобных вирусов и получения нуклеотидной последовательности полного генома с помощью ВПС были подобраны специфические праймеры для вируса Алонгшан (Таблица 1).

Для детекции флавиподобных вирусов проводили аналитическую ПЦР: к 2,5 мкл кДНК, полученной при обратной транскрипции, добавляли 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), 2 мкл 2,5 mM смеси dNTP, по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров (1,5 о.ед./мл), 0,5 мкл термостабильной ДНК-полимеразы DreamTaq (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и 12,5 мкл тридистиллированной воды (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»). Реакционный цикл ПЦР (20 секунд при 95°C (денатурация), 30 – 60 секунд для отжига праймеров (время отжига зависело от длины фрагмента, температуры отжига

представлены в Таблице 1 для каждой пары праймеров) и 90 секунд при 72°C (элонгация)) повторяли 40 раз.

Для последующего секвенирования вирусов ПЦР проводили в двойном объеме смеси при сохранении пропорций входящих в неё компонентов.

2.4.5 Аналитический электрофорез в агарозном геле

Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,5% агарозном геле (агароза TopVision Agarose, Fermentas) на 1%-ном буфере TAE (0,04 М Трис, 0,04 М CH₃COOH, 2 мМ EDTA) с добавлением 5 мкл насыщенного раствора бромистого этидия. В форму для заливки вставляли гребенки для образования лунок для нанесения образцов и вносили 1,5%-ный агарозный гель. Гель застывал при комнатной температуре. Перед внесением ПЦР-продукта в лунки агарозного геля его смешивали с 1/6 объема буфера для нанесения (6x Loading dye, Fermentas). Электрофорез проводили в 1%-ном буфере TAE при напряжении 120 В. Результаты оценивали визуально в УФ-свете с помощью трансиллюминатора.

2.4.6 Препаративный электрофорез и выделение ПЦР-фрагмента из агарозы

Препаративный электрофорез проводили в 1%-ном агарозном геле (агароза TopVision Agarose, Fermentas) с добавлением 5 мкл насыщенного раствора бромистого этидия. После окончания электрофореза ПЦР-фрагмент необходимой длины вырезали и помещали в 1,5 мл пробирку типа эппендорф.

Выделение ПЦР-фрагмента из агарозного геля проводили с помощью коммерческого набора реагентов QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Полученный чистый ПЦР-фрагмент в дальнейшем использовался для секвенирования.

2.4.7 Секвенирование ДНК по Сэнгеру

Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с помощью программы SeqMan (DNASTar, Мадисон, Висконсин, США).

Таблица 1 – Список праймеров, использованных в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера	Направление праймера	Место в геноме	Размер ампликона, нт	Температура отжига, °C
Панфлави праймеры					
MAMD	AACATGATGGGRAARAGRGARAA	Прямой	NS5	250	50
cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	Обратный			
Праймеры на вирус Алонгшан					
MiassF	GGTACACGGACCTGGGATCCTATTG	Прямой	Сегмент 1	825	50
MiassR	TCTCTGACTCCTGTTCTAATC	Обратный			
JMun1S	TTAAAARCGGCCAGCCTTNRYTGCAAGTGCA	Прямой	Сегмент 2	1800	55
Miass_gly_1R	ACCAGGTTGGTCAAGGCAAT	Обратный			
Miass_gly_3F	TGGATCAGCTCACACCACAC	Прямой	Сегмент 2	333	53
Miass_gly_3R	TCACCGTCACAGTGGAATGG	Обратный			
JVsenseV1add	GGTACACGGACCTGGGATCCTATTG	Прямой	Сегмент 1	275	50
JVasenseV1	TAGGCCCTGACCAGCCACGCTCC	Обратный			
JVsenseV1add	GGTACACGGACCTGGGATCCTATTG	Прямой	Сегмент 1	819	50
Mi1-2320as	TCTCTGACTCCTGTTCTAATC	Обратный			
Alongshan_seg1_5	AAGTGCAACAGTTGAGGGTC	Прямой	Сегмент 1	800	52
Miass_NS5_1R	CCTTTTGGGTGTAGGGGACC	Обратный			
Miass_VP1a_F3	GCTTGTAAGCTAGCGACTGGA	Прямой	Сегмент 1	1315	53
Miass_gly_3R	TCACCGTCACAGTGGAATGG	Обратный			
Miass_gly_2F	GATTACCCACTGGGCAGGAC	Прямой	Сегмент 2	682	54

Miass_gly_1R	ACCAGGTTGGTCAAGGCAAT	Обратный			
Miass_gl_1F	CCACATCACGGGAGGTATCG	Прямой	Сегмент 2	1242	51
Alongshan_seg2_3	CGGGCTAACTCTCTCACTTG	Обратный			
Праймеры на вирус клещевого энцефалита					
Kgg32	ATGTATTCATCTGTTTCGTCC	Обратный	NS3		
Kgg65	AGATTTTCTTGCACGT	Прямой	5'НТО	1100	50
TBE1095r	G(C/a)GTCAAGCCACACATCC	Обратный	E		
Kgg35	CTGACCGTGGAAGTGTGG	Прямой	M	1500	55
Kgg26	AAGCTCATGGACATGGTAGG	Обратный	E		
Kgg16	AGGGGAGCAGCATTGGAAG	Прямой	E	1200	55
Kgg30	TGGTGCTCCTCACAGAAGC	Обратный	NS1		
Kgg37	GCAGAACAAGTGAAAGGACC	Прямой	NS1	1300	52
Kgg38	TCTGATAGCGTCCACAGTCC	Обратный	NS2b		
Kgg31	AAAGGCAGCATTGTGACCTG	Прямой	E	361	52
Kgg19	CGTGTCTCCACGGCAGAGCC	Обратный	E		
Праймеры на рабдовирус					
Rhabdo_L_1F	GGGTTTGTGGTTAATTTGTC	Прямой	L сегмент	392	50
Rhabdo_L_1R	AGTGAGGACTGGATAAAAGA	Обратный	L сегмент		

2.4.8 Высокопроизводительное секвенирование

Тотальная РНК полученная из осадка после УЦФ была фрагментирована и обратно транскрибирована в кДНК с использованием гексамерного праймера (R6) и обратной транскриптазы RevertAid (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с последующим синтезом второй цепи с помощью модуля синтеза второй цепи NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second-Strand Synthesis Module (New England Biolabs Inc., Ипсвич, Массачусетс, США). Полученная двухцепочечная ДНК была очищена с использованием Ampure XP (Beckman Coulter, Бри, Калифорния, США) и была использована в качестве входных данных для процесса подготовки библиотеки с использованием набора NEBNext® Fast DNA Library Prep Set для Ion Torrent™ (New England Biolabs Inc., Ипсвич, Массачусетс, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную библиотеку ДНК оценивали количественно с помощью Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с последующим созданием шаблона в Ion Chef приборе (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и секвенированием на Ion S5XL, с вирусной библиотекой, составляющей часть Ion 530 Chip. Необработанные риды были отфильтрованы по качеству с использованием FaQC v2.09 [179] и собраны в контиги с использованием SPAdes v3.13.0 [88]. Полученные контиги были проверены на вирусные последовательности с использованием алгоритма Blastn в BLAST v2.9.0 и соответствовавшие вирусу были использованы для дальнейшего изучения.

ВПС было проведено сотрудниками Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи Щетининым А.М. и Гуциным В.А. Первичный анализ полученных ридов проведен совместно с сотрудником лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Литовым А.Г.

2.4.9 Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа ВКЭ использовали последовательности РНК белка Е всех штаммов ВКЭ сибирского подтипа и некоторые штаммы других подтипов из GenBank. Нуклеотидные последовательности областей генома, кодирующих белок Е, выравнивали с помощью ClustalW. Филогенетический анализ проводили методом

максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) по фрагменту генома, кодирующего белок E в программе MEGA X.

Для филогенетического анализа флавиподобных вирусов были использованы последовательности РНК всех опубликованных полных геномов штаммов вирусов Алонгшан, Янгтоу и представителей вируса Джингмен (на 27 января 2021 г.) и все ампликоны (из образцов, в которых вирус был обнаружен, но не выделен на культурах клеток) и штаммы, описанные в этой работе. Нуклеотидные последовательности кодирующих областей генома сегментов 1 и 2 вируса Алонгшан выравнивали отдельно с помощью ClustalW. Филогенетический анализ фрагментов 1-го и 2-го сегментов проводили методом ближайшего соседа в программе MEGA X.

Чтобы идентифицировать открытые рамки считывания в сегменте 2 вируса Алонгшан, мы использовали программу Snap Gene с вариантами трансляции: минимальная длина 75 аминокислот, выбранные варианты «Требовать стартовый кодон ATG» и «кроме концов ДНК» и «Стандартные» варианты генетического кода для открытых рамок считывания и новых функций. Полные аминокислотные последовательности VP1a, VP1b и новой открытой рамки считывания (nuORF) [159] были использованы для проведения филогенетического анализа методом ближайшего соседа в программе MEGA X.

2.4.10 Статистическая обработка

В ходе работы для сравнения показателей зараженности клещей ВКЭ использовали точный двусторонний критерий Фишера.

Минимальный уровень заражения (МУЗ) рассчитывали по формуле
$$\text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}},$$
 где ПП – количество положительных пулов, ПК – количество положительных индивидуальных клещей, ИК – общее количество исследованных клещей.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сравнение методов выявления вируса клещевого энцефалита в биологических материалах

КЭ является одним из наиболее серьезных и распространенных природно-очаговых вирусных заболеваний с поражением центральной нервной системы на территории России. Кроме ВКЭ на территории России циркулируют следующие флавивirusы, в клещах: вирус ОГЛ [82], вирус Повассан [174] вирус ШЭО [173], в комарах: вирус Западного Нила [203], вирус японского энцефалита [54] и вирус Ламми [55]. Органы Роспотребнадзора постоянно осуществляют мониторинг распространения ВКЭ на эндемичных территориях. Комары и небольшое количество клещей, собранные на юге России, тестируются на наличие вируса Западного Нила территориальными органами Роспотребнадзора. Выявление и оценка распространения других флавивirusов не осуществляется.

Целью данной работы являлся поиск и характеристика переносимых клещами флави- и флавиподобных virusов, циркулирующих на границе ареала ВКЭ на территории Российской Федерации. Для этого было необходимо четко очертить эти границы.

На первом этапе работы было необходимо оценить специфичность и чувствительность методов выявления ВКЭ в клещах. К началу данной работы большая часть лабораторий, проводящих мониторинг распространения ВКЭ на основании данных о наличии virusа в клещах, использовало для этих целей коммерческие наборы на основе ИФА. Наиболее часто используемым коммерческим набором являлась тест-система «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО, Вектор-Бест). Ранее Беловой О.А. с соавторами было проведено сравнение эффективности детекции ВКЭ в иксодовых клещах с помощью коммерческой тест-системы «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО, Вектор-Бест) на основе ИФА и коммерческих наборов на основе ПЦР-РВ («РеалБест РНК ВКЭ»; ЗАО «Вектор-Бест» и «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* – FL»; ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Было показано, что эффективность выявления ВКЭ не зависит от пола, вида и степени насыщенности клеща; метод ИФА оказался менее чувствительным, чем ПЦР-РВ и чувствительность ИФА зависела от подтипа ВКЭ и протокола проведения ИФА («Инкубация 3 часа» или «Инкубация ночь») [5]. Тем не

менее, выявление ВКЭ на неэндемичных территориях ставило вопрос о специфичности метода и возможных причинах ложноположительных реакций.

3.1.1 Оценка специфичности ИФА и ПЦР-РВ для выявления ВКЭ по отношению к другим представителям рода *Flavivirus*

Под специфичностью метода понимают долю истинно отрицательных результатов среди всех проведенных тестов. Для оценки специфичности методов мы взяли 3 штамма ВКЭ, относящихся к различным подтипам (европейский, сибирский и дальневосточный), и 3 вируса из группы переносимых клещами флавивирусов млекопитающих, которые, как известно, характеризуются перекрестами в серологических реакциях [103]. В работе были использованы коммерческие тест-системы на основе ИФА – «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»), на основе ПЦР-РВ – набора реагентов серии «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»). Кроме того мы исследовали вирусы в ПЦР с использованием праймеров на фрагмент генома, кодирующего белок NS5 флавивирусов (панфлави) [216].

Все вирусы, использованные в работе, показали положительный результат при использовании тест-системы «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»), но в различных концентрациях (Таблица 2).

При исследовании вирусов с помощью набора реагентов серии «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»), три штамма ВКЭ, представители основных 3-х генотипов вируса, выявлялись в концентрации 2,2 – 2,6 IgБОЕ/мл. Вирус ШЭО был выявлен в концентрации 2,3 IgБОЕ/мл. Производителем тест-системы, в инструкции по применению набора, указывается, что вирусы ОГЛ и Лангат не детектируются. В наших исследованиях это подтвердилось (Таблица 2).

ПЦР-РВ является более специфичным методом, однако, и он давал положительную реакцию с филогенетически наиболее близким к ВКЭ вирусом ШЭО [76].

ПЦР с использованием панфлави праймеров выявляла все используемые флавивирусы в концентрации меньшей, чем ИФА. В дальнейших исследованиях по выявлению флави- и флавиподобных вирусов мы использовали ПЦР с панфлави праймерами.

Таблица 2 – Оценка специфичности различных методов выявления ВКЭ с использованием представителей рода *Flavivirus* [76]

Вирус	Минимально выявляемые концентрации вируса, lgБОЕ/мл		
	ИФА ¹	ПЦР-РВ ²	ПЦР ³
ВКЭ – штамм Абсеттаров, Европейский подтип	5,2	2,2	2,2
ВКЭ – штамм ЭК-328, Сибирский подтип	5,5	2,5	2,5
ВКЭ – штамм СофьинКГГ, Дальневосточный подтип	5,6	2,6	2,6
вирус Омской геморрагической лихорадки – штамм Никитина (максимальная концентрация 8,7 lgБОЕ/мл)	6,3	не выявили	2,3
вирус Лангат – штамм ТР-21 (максимальная концентрация 8,7 lgБОЕ/мл)	6,7	не выявили	2,7
вирус шотландского энцефаломиелита овец – штамм S1	3,2	2,3	2,2

¹ вирусные суспензии были приготовлены на среде 199 на растворе Эрла и разведены коммерческим раствором для разведения исследуемых образцов в соотношении 1:1, ИФА проводили тест-системой «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»);

² полимеразная цепная реакция в режиме реального времени проводили набором «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»);

³ полимеразная цепная реакция проводилась с использованием праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 флавириусов (панфлави) – cFD2-MAMD [216].

3.1.2 Влияние отклонений в пробоподготовке на чувствительность коммерческой тест-системы на основе ИФА при выявления ВКЭ в клещах

Гомогенизацию клещей необходимо проводить в физиологическом растворе или питательной среде, если при проведении мониторинга предполагается дальнейшая изоляция вируса. Длительное хранение клещей подразумевает их размораживание перед исследованием. Промывка клещей в спирте после размораживания может приводить к потере материала из-за попадания спирта внутрь клеща. В связи с этим в начале своей работы мы оценили чувствительность и специфичность наиболее часто используемого коммерческого набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО, Вектор-Бест) на основе ИФА при отклонении в пробоподготовке.

Под чувствительностью метода принято считать долю истинно положительных результатов среди всех проведенных тестов. Для оценки влияния отклонений от протокола пробоподготовки на чувствительность ИФА были введены следующие изменения:

1. гомогенизировали клещей в среде 199 на растворе Эрла, а не в растворе для разведения исследуемых образцов (РРИО);

2. не обрабатывали клещей 70% этанолом перед суспензированием.

В первом эксперименте были использованы экспериментально зараженные двумя штаммами ВКЭ (штамм Абсеттаров – европейского подтипа и штамм ЭК-328 – сибирского подтипа) клещи 5 видов *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. marginatus*, *D. nuttalli*, *D. reticulatus*. Клещей суспензировали в среде 199 на растворе Эрла. Одну часть клещевых суспензий вносили в лунки стрипов сразу (модификация 1), а в другую добавляли РРИО в соотношении 1:1 и потом вносили в лунки стрипов (модификация 2).

При подготовке 94 клещей с модификацией 1 чувствительность ИФА составила 36,2%. При подготовке 51 клеща с модификацией 2 – 39,2% (Таблица 3) [76].

Таблица 3 – Результаты детекции ВКЭ в клещах при нарушении условий пробоподготовки

Вид клеща	Число положительных результатов при проведении ИФА с модификацией 1				Число положительных результатов при проведении ИФА с модификацией 2			
	Доза штамма ЭК-328, lgБОЕ/клещ		Доза штамма Абсеттаров, lgБОЕ/клещ		Доза штамма ЭК-328, lgБОЕ/клещ		Доза штамма Абсеттаров, lgБОЕ/клещ	
	2 lgБОЕ	4 lgБОЕ	4 lgБОЕ	6 lgБОЕ	2 lgБОЕ	4 lgБОЕ	4 lgБОЕ	6 lgБОЕ
<i>I. ricinus</i>	1/8	6/8	3/7	1/11	-	-	-	-
<i>I. persulcatus</i>	2/9	1/4	5/8	2/8	-	0/3	-	1/4
<i>D. marginatus</i>	2/8	2/2	1/2	2/4	-	5/6	2/6	3/8
<i>D. nuttalli</i>	0/3	2/2	0/1	2/3	0/3	3/5	0/5	2/3
<i>D. reticulatus</i>	0/2	-	1/2	1/2	1/2	2/3	1/2	0/1
Итого	5/30	11/16	10/20	8/28	1/5	10/17	3/13	6/16

Полученные данные статистически достоверно отличаются от чувствительности ИФА для всех видов клещей (82,5%) [5], проведенным по протоколу «Инкубация 3 часа» в строгом соответствии с инструкцией (точный двусторонний критерий Фишера, $p < 0,01$). Таким образом, при нарушении протокола пробоподготовки чувствительность метода снизилась более чем в 2 раза.

Для оценки возможных ложноположительных реакций были исследованы 205 иксодид разных видов, собранных в Московской области и республике Татарстан, и разделенные на пулы по 1-7 особи (всего 83 пробы). 64 пробы клещей гомогенизировали в среде 199 на растворе Эрла, а потом добавляли РРИО в соотношении 1:1. Из

оставшихся 19 пулов были приготовлены пробы тем же способом, но перед суспензированием клещей не промывали в 70% этиловом спирте. Как было показано ранее [5] и в Таблице 1, ПЦР является более чувствительным методом, чем ИФА, при выявлении ВКЭ в клещах. Поэтому все пулы были проверены методом ПЦР на наличие РНК вирусов рода *Flavivirus* с использованием праймеров MAMD и cFD2 (панфлави) и 25 пулов на наличие ВКЭ с использованием праймеров Kgg19 и Kgg31, обеспечивающих более высокую чувствительность по сравнению с панфлави праймерами [62], с последующим электрофоретическим анализом. Ни одна из проб не содержала вирусной РНК. При исследовании пулов с помощью ИФА в 4 из 28 пулов, при подготовке которых клещей промывали в 70% этаноле перед суспензированием, и в 5 клещах из 36, приготовленных индивидуально, оказались положительными на наличие ВКЭ (14% положительных проб). В случае, когда клещей не промывали в спирте перед суспензированием, 13 пулов из 19 показали положительный результат (68% положительных проб) (Таблица 4) [76].

Таблица 4 – Результаты детекции ВКЭ с помощью коммерческого набора «ВектоВКЭ-антиген» на основе ИФА при наличии или отсутствии в процессе пробоподготовки стадии обработки 70% этанолом клещей перед суспензированием

Вид клеща	Число положительных результатов у обработанных 70% этанолом клещей		Число положительных результатов у необработанных 70% этанолом клещей
	пулы	индивидуальные особи	пулы
<i>I. ricinus</i>	4/9	5/18	6/9
<i>I. persulcatus</i>	0/6	-	4/4
<i>D. reticulatus</i>	0/12	0/18	3/6
<i>D. marginatus</i>	0/1	-	-
Итого:	4/28	5/36	13/19

Несмотря на то, что нарушение протокола пробоподготовки при постановке ИФА приводит к снижению чувствительности метода более чем в 2 раза, с помощью ИФА были выявлены пробы, положительные на наличие антигена ВКЭ, в то время как более чувствительным методом вирусная РНК в этих пробах не была обнаружена.

3.1.3 Оценка возможных неспецифических реакций в ИФА с микроорганизмами, обитающими в клещах, при использовании коммерческой тест-системы

Мы предположили, что ложноположительные результаты могут быть следствием неспецифических реакций с микроорганизмами, обитающими в клещах. Для выделения микроорганизмов, обитающих в клещах, 50 мкл клещевой суспензии, положительной в ИФА на наличие антигена ВКЭ, наносили на чашки Петри с колумбийским агаром с 5%-ной бараньей кровью, и рассевали методом секторных посевов (по Голду–Родману). Чашки Петри помещали в CO₂ инкубатор на 24 часа. Идентификация микроорганизмов проводилась сотрудниками ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии [43]. При микробиологическом исследовании положительных в ИФА клещевых суспензий (клещи из природы) были получены 12 видов бактерий, представленные 15 изолятами. Бактериальные суспензии были уравнены по концентрации белка, определенной по методу Бредфорда, до 3 и 6 мг/мл и исследованы с помощью набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»).

Из 15 исследованных изолятов микроорганизмов 4 изолята, представлявшие виды *Pseudomonas luteola*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus weihenstephanensis*, оказались положительными в ИФА на наличие ВКЭ (Таблица 5). Один вид бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* был выделен из клещей после стандартной пробоподготовки, два вида бактерий *Pseudomonas luteola* и *Bacillus weihenstephanensis* – из клещей, в пробоподготовке которых отсутствовала стадия обработки 70% спиртом перед суспензированием.

Таблица 5 – Анализ микроорганизмов, выделенных из клещей, на серологические перекресты в тест-системе на основе ИФА для выявления ВКЭ [76]

Отдельные клещи и пулы	Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/50 мкл	Результаты ИФА ¹	
			6 мг/мл	3 мг/мл
6♀ <i>I. persulcatus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	сливной	отр	отр
5♂ <i>I. ricinus</i>	нет			
5♂ <i>I. persulcatus</i>	<i>Cupriavidus pauculus</i>	14 КОЕ	отр	отр
7♀ <i>I. persulcatus</i>	нет			
5♀ <i>I. ricinus</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	сливной	отр	отр
	<i>Serratia liquefaciens</i>	сливной	отр	отр
5♂ <i>I. persulcatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	3 КОЕ	отр	отр
3♂ <i>D. reticulatus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	3 КОЕ	отр	отр

5♂ <i>I. ricinus</i>	нет			
6♀ <i>D. reticulatus</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	4 КОЕ	пол	пол
7♂ <i>I. ricinus</i>	нет			
3♀ <i>I. ricinus</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	сливной	пол	пол
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	сливной	отр	отр
5♂ <i>I. ricinus</i>	нет			
5♂ <i>I. ricinus</i>	нет			
1♀ <i>I. ricinus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	100 КОЕ	отр	отр
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	200 КОЕ	пол	пол
1♀ <i>I. ricinus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	4 КОЕ	отр	отр
	<i>Acinetobacter junii</i>	35 КОЕ	отр	отр
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50 КОЕ	пол	пол
1♀ <i>I. ricinus</i>	нет			
1♀ <i>I. ricinus</i>	<i>Acinetobacter junii</i>	30 КОЕ	отр	отр
1♀ <i>I. ricinus</i>	нет			

¹ суспензии микроорганизмов были уравнены по концентрации белка, определенной по методу Бредфорда, до 3 и 6 мг/мл

Таким образом, одной из причин ложноположительных реакций при проведении ИФА может являться неспецифическое взаимодействие с микроорганизмами, обитающими в клещах.

3.1.4 Обсуждение

В 2010-х годах основным методом исследования клещей на наличие ВКЭ являлся ИФА. Доля исследований с использованием ПЦР составляла только 40%. В последние годы в западной и юго-западной частях РФ, ранее считавшихся неэндемичными по КЭ, в которых не регистрировались случаи заболевания, участились случаи обнаружения антигена ВКЭ в клещах с помощью ИФА. Так, например, в Ставропольском крае в 2010 году был обнаружен антиген ВКЭ в клещах *D. marginatus* с помощью ИФА [17]. Попытки выявления вируса в этих материалах с помощью вирусологических и молекулярных методов не увенчались успехом. На основании выше сказанного можно было бы предположить, что метод ИФА является более чувствительным, по сравнению с ПЦР, и его применение более оправдано. С другой стороны, работы, проведенные с

использованием экспериментально зараженных ВКЭ клещей [5], и с большим количеством клещей из природы [24] показали, что метод ПЦР более чувствителен и специфичен, чем ИФА. Тем не менее, требовалось экспериментальное объяснение причин возникновения ложноположительных реакций [76].

Наши данные демонстрируют, что отклонения в пробоподготовке приводят к снижению чувствительности ИФА. Также представленные нами данные показывают, что ИФА может давать ложноположительные реакции. В данной работе мы выявили некоторые возможные причины появления ложноположительных реакций в ИФА:

- перекрестные реакции с флавивирусами млекопитающих, переносимых клещами;
- перекрестные реакции с микроорганизмами, обитающими в клещах.

Флавивирусы млекопитающих, переносимых клещами, настолько близки антигенно и генетически, что неудивительно возникновение серологических перекрестов в ИФА и выявление вируса ШЭО даже более чувствительным и специфичным методом ПЦР-РВ. На основании этих данных нельзя исключить возможность циркуляции в природной популяции клещей неизвестных флавивирусов, которые могут быть выявлены как в ИФА, так и в ПЦР.

С помощью ИФА и ПЦР нам удалось выявить бактерии рода *Pseudomonas* spp. при анализе клещей из природы. Возникновение ложноположительных реакций, по-видимому, произошло вследствие накопления большого количества бактерий этого рода в клещах. В предыдущей работе, посвященной вопросу сравнения методов детекции ВКЭ в клещах, не были выявлены причины возникновения ложноположительных реакций [5]. В этой работе для анализа использовали клещей, прошедших полную генерацию в лабораторных условиях, и отсутствие ложноположительных реакций можно объяснить тем, что при переходе на последующую фазу развития в клещах снижается уровень бактериальной и вирусной нагрузки, которую они возможно получили в природе [31, 79].

Представленные данные показывают преимущество ПЦР в определении зараженности клещей ВКЭ по сравнению с ИФА. Для установления циркуляции ВКЭ на новых территориях и в спорных случаях необходимо определение нуклеотидной последовательности продукта ПЦР для идентификации инфекционного агента [76].

Представленные данные послужили экспериментальной основой для перехода большинства лабораторий Роспотребнадзора с ИФА на ПЦР для проведения мониторинга ВКЭ при исследовании клещей.

Наши результаты, показывающие широкий спектр флавивирусов, которые детектируются панфлави праймерами, подтвердили ранее полученные данные [68, 216]. Мы использовали эту пару праймеров для дальнейшей работы по выявлению флави- и флавиподобных вирусов на территории России.

3.2 Выявление и изоляция флави- и флавиподобных вирусов на границах ареала вируса клещевого энцефалита в России

3.2.1 Выбор регионов исследования

К моменту начала нашего исследования имелись работы, представляющие обобщенные данные за большие промежутки времени о распространении ВКЭ на территории России [19, 41, 163], а также заболеваемости КЭ в РФ [119, 134, 226], и приведены карты распространения ВКЭ [81] без указания источника информации и упоминания о том, каким образом выявляли вирус. Как было показано выше, это может иметь большое значение для оценки достоверности данных.

Наиболее значимые процессы эволюции арбовирусов можно ожидать на границах ареала и в зонах совместного обитания различных видов клещей, где высока вероятность возникновения новых вариантов вируса в связи со сменой переносчиков и основных прокормителей.

Мы создали карту распространения КЭ на основе данных Роспотребнадзора об эндемичных по КЭ территориях (Рисунок 12), в основе которой лежат случаи регистрации заболевания КЭ, поскольку мы не могли опираться на данные о распространения вируса, полученные с помощью ИФА. Полученная карта была использована в обзоре по КЭ [212].

Случаи КЭ регистрируются на территориях 65 из 85 субъектов РФ, и только 48 субъектов России являются эндемичными по КЭ, т.е. на их территории регистрируются завозные случаи этого заболевания. Районы значительно различаются по уровню заболеваемости. Очевидно, что границы распространения ВКЭ будут шире.



Рисунок 12 – Эндемичные по клещевому энцефалиту территории России. Карта была подготовлена на основе официальных данных Роспотребнадзора России об эндемичных по клещевому энцефалиту территориях [212]. Цифры указывают на уровень заболеваемости КЭ в данном регионе на 100 тыс. населения.

В последние десятилетия наблюдается расширение ареала ВКЭ на север. Северная граница распространения ВКЭ простирается от Норвегии, Швеции и Финляндии в Европе до Хабаровского края на Дальнем Востоке России [137, 177, 212, 221]. Основными причинами наблюдаемых явлений считается изменение климата и антропогенный фактор [164, 183].

По направлению с севера на юг лесные зоны переходят в лесостепные (место совместного обитания клещей родов *Dermacentor* и *Ixodes*) и степные зоны, где доминируют клещи рода *Dermacentor*. В связи с этим определение южной границы распространения ВКЭ осложнено, т.к. не ясна роль клещей рода *Dermacentor* в поддержании стойких самостоятельных очагов КЭ.

Для исследования были выбраны регионы на границе ареала ВКЭ в различных зонах. На северо-западной границе распространения ВКЭ была выбрана Калининградская область, как место обитания основного клеща-переносчика ВКЭ *I. ricinus*, и Республика Карелия, которая является зоной симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. На южной границе – республики Тыва и Татарстан, Ульяновская и Челябинская области, где имеются зоны совместного обитания клещей родов *Ixodes* и

Dermacentor и зоны обитания только клещей рода *Dermacentor*, а также Ставропольский край, где никогда не регистрировали заболеваемость КЭ, но при этом отмечено выявление антигена ВКЭ в ИФА [9].

3.2.2 Республика Карелия

Республика Карелия расположена на северо-западе Российской Федерации. На севере Карелия граничит с Мурманской областью, на юге – с Вологодской и Ленинградской, на востоке – с Архангельской. Западная граница Карелии совпадает с государственной границей России с Финляндией. Климат Карелии умеренно-континентальный с признаками морского. Средняя температура зимних месяцев минус 13°C, летних - плюс 13°C. Карелия – это крупнохолмистая равнина с обширными болотными пространствами и скальными выходами магматических (граниты, габбро, диабазы) и метаморфических (сланцы, мраморы, слюды) горных пород. Территория республики располагается в зоне средней и северной тайги, здесь произрастают леса хвойных пород, в основном, сосны и ели [56, 60].

Сбор клещей проводился на флаг с мая по июнь 2012 – 2014 гг. и 2018 году. Всего было собрано и исследовано 1963 клеща (Таблица 6), из них *I. persulcatus* – 1872 взрослые особи и 2 нимфы, и *I. ricinus* – 89 взрослых особей. Группировки мест сбора (точка) проводили согласно географическому расположению (Рисунок 13).

Таблица 6 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Республике Карелия

Данные места сбора		Клещи		Способ сбора флаг/животное
Широта	Долгота	<i>I. persulcatus</i>	<i>I. ricinus</i>	
62.06906667°	33.96141667°	46♂, 61♀		флаг
62.06558333°	33.9585°	34♂, 39♀		флаг
62.07098333°	33.95605°	6♂, 7♀		флаг
62.06785°	33.94811667°	7♂, 6♀		флаг
62.0693°	33.93928333°	13♂, 7♀		флаг
62.0656°	33.93786667°	21♂, 22♀		флаг
62.06866667°	33.9558°	3♂, 2♀		флаг
62.06558333°	33.9489°	4♂, 4♀		флаг
62.0569°	33.90941667°	30♂, 31♀		флаг
62.06741667°	33.9751833°	35♂, 39♀		флаг
61.839716667°	34.39935°	10♂, 1NN		флаг
61.4894833°	34.8331°	1♂, 1♀		флаг
61.48428333°	34.83981667°	8♂, 5♀, 1NN		флаг

61.4715833°	34.872°	5♂, 9♀	1♀	флаг
61.45285°	35.06368333°	2♂, 1♀		флаг
61.3608333°	35.4412833°	4♂, 6♀	2♀	флаг
61.38268333°	35.348233°	4♂, 8♀	5♀	флаг
62.09286667°	35.196533°	4♂, 6♀		флаг
62.09588333°	35.20738333°	1♂, 1♀		флаг
62.05408333°	35.2523833°	17♂, 16♀		флаг
62.1109°	35.20146667°	9♂, 12♀		флаг
62.11073333°	35.16896667°	3♂, 1♀		флаг
62.10736667°	35.1718333°	3♂, 2♀	1♂	флаг
62.07518333°	35.203667°	6♂, 6♀		флаг
62.05591667°	35.20851667°	1♂, 3♀		флаг
62.48491667°	31.226433°	4♂, 12♀		флаг
62.385833°	31.12685°	6♂, 6♀		флаг
62.342916667°	31.00335°	7♂, 12♀		флаг
62.3462667°	30.99165°	6♀		флаг
61.6718°	31.02995°		4♂, 6♀	флаг
61.36638333°	30.8858667°	4♂, 3♀		флаг
61.36656667°	30.8982667°	1♂, 1♀		флаг
61.3603333°	30.89645°	1♂, 1♀		флаг
61.39248333°	30.94158333°	1♀		флаг
61.3942°	30.94816667°	6♂, 5♀		флаг
61.3997333°	30.9516333°	12♂, 16♀		флаг
61.39596667°	30.95738333°	3♂, 6♀		флаг
61.3946°	30.9651°	12♂, 8♀	1♂, 2♀	флаг
61.3667333°	30.96146667°	1♂, 2♀		флаг
61.36218333°	30.9273°	1♂, 1♀	1♂	флаг
61.3906667°	30.91231667°	9♂, 16♀	4♂, 5♀	флаг
61.36636°	30.88581°	6♂, 6♀	2♀	флаг
61.36095°	30.8878333°	1♂, 1♀	1♂	флаг
61.388665°	30.904965°	3♂, 6♀	5♂, 4♀	флаг
61.392135°	30.914050°	2♂, 3♀		флаг
61.391426°	30.909165°	4♂, 7♀		флаг
61.3942°	30.94816667°	3♂, 5♀	3♂, 6♀	флаг
61.3941°	30.94817°	2♂, 3♀	1♀	флаг
61.3947°	30.9654333°	6♂, 2♀	1♂	флаг
61.39065°	30.9124°	2♂, 6♀	3♂, 3♀	флаг
61.38396667°	30.93511667°	1♂, 1♀		флаг
61.38275°	30.93801667°	2♀	1♀	флаг
61.39421°	30.94825°	4♂, 13♀	1♂, 5♀	флаг
61.399916667°	30.95125°	6♂, 14♀	5♂, 1♀	флаг
61.39477°	30.96577°	15♂, 12♀	4♂, 2♀	флаг
61.3968°	30.99126667°	11♂, 4♀	4♂, 5♀	флаг
62.069306°	33.964447°	14♂, 16♀		флаг

62.063057°	33.961113°	5♂, 13♀		флаг
62.065657°	33.957460°	24♂, 21♀		флаг
62.075051°	33.951404°	21♂, 12♀		флаг
62.065236°	33.954858°	19♂, 19♀		флаг
62.063259°	33.959555°	5♂		флаг
62.076495°	33.950999°	23♂, 26♀		флаг
62.061621°	33.956321°	6♂, 7♀		флаг
62.077452°	33.950400°	18♂, 23♀		флаг
62.069905°	33.965143°	62♂, 69♀		флаг
62.075230°	33.946687°	17♂, 10♀		флаг
62.067203°	33.933651°	28♂, 10♀		флаг
62.072465°	33.957672°	10♂, 5♀		флаг
62.070669°	33.956407°	3♂, 3♀		флаг
62.072395°	33.956022°	6♀		флаг
62.058623°	33.942770°	11♀		флаг
61.371517°	31.699517°	8♂, 14♀		флаг
61.37065°	31.71575°	5♂		флаг
61.31915°	31.861683°	18♂, 4♀		флаг
61.366833°	31.603567°	2♂		флаг
61.363017°	31.634333°	5♂, 22♀		флаг
62.069905°	33.965143°	68♂, 106♀		флаг
62.069644°	33.956797°	32♂, 21♀		флаг
62.067203°	33.933651°	32♂, 14♀		флаг
62.060627°	33.938344°	16♀		флаг
62.072465°	33.957672°	15♂, 14♀		флаг
Итого:		887♂, 995♀, 2NN	38♂, 51♀	флаг

NN – нимфы

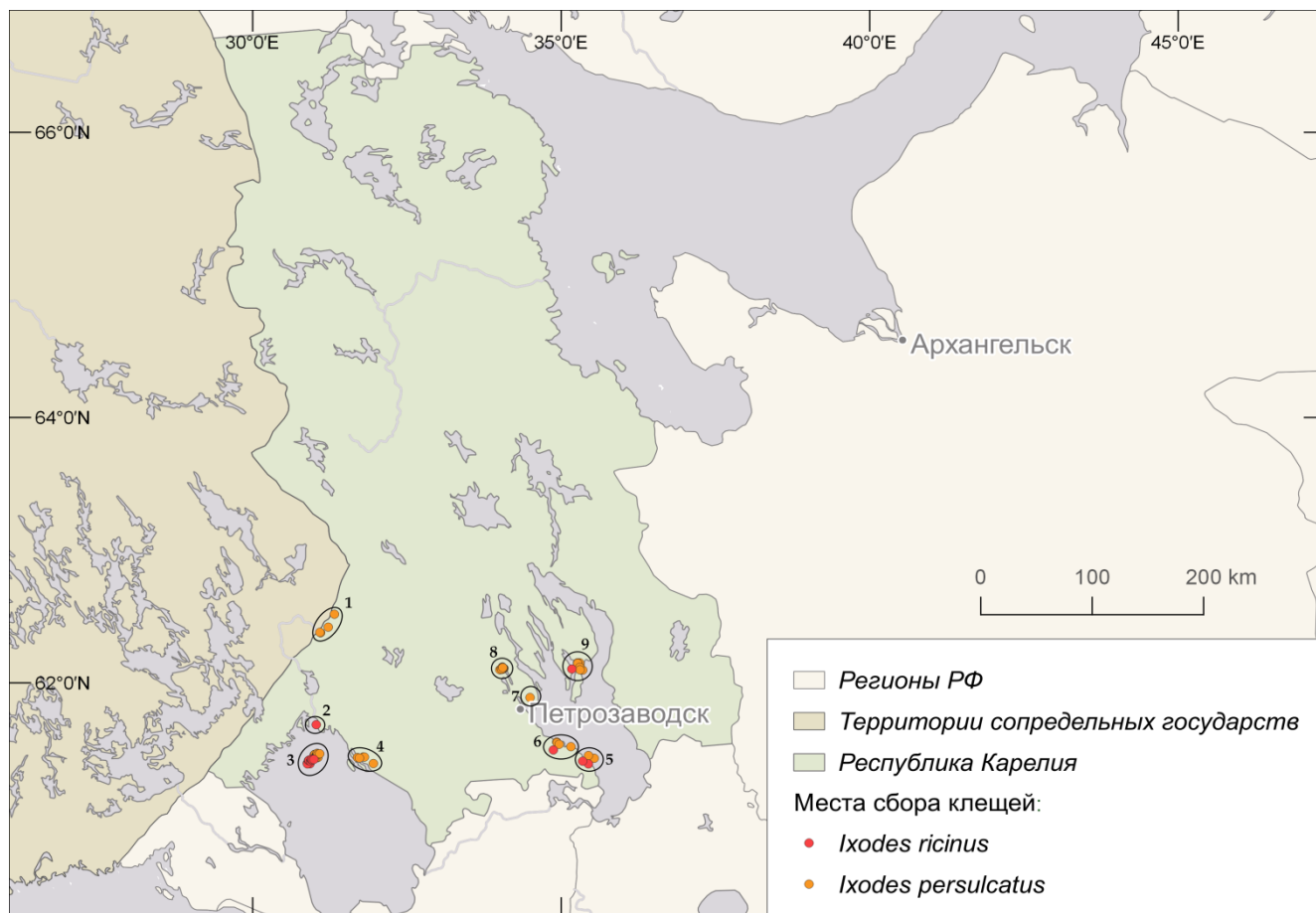


Рисунок 13 – Места сбора клещей в республике Карелия

3.2.2.1 Флавивирусы

Выявление вируса клещевого энцефалита

Собранные клещи были исследованы на наличие РНК ВКЭ с помощью праймеров на фрагмент генома, кодирующего белок Е (Kgg19 и Kgg31). Всего было выявлено 7 положительных проб (Таблица 7).

Таблица 7 – Распространенность вируса клещевого энцефалита

Точка на карте ¹	Вид клеща	Кол-во проанализированных клещей	Кол-во проанализированных пулов/индивидуально	Кол-во положительных проб	Штамм	GenBank	МУЗ (%)
3	<i>I. ricinus</i>	70		0			< 1,4
	<i>I. persulcatus</i>	261		2	Valaam13-T17012 Valaam14-T20273	MT424734 MT424735	0,8
7	<i>I. persulcatus</i>	58	12/0	1	Karl12-T16353	MT889225	1,7

8	<i>I. persulcatus</i>	1265	265/0	4	Karl14-T20468	MT424738	0,3
					Karl14-T20639	MT424739	
					Karl18-T27106	MT424736	
					Karl18-T27118	MT424737	

¹ точки представлены на Рисунке 13;

$$^2 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

Вирусофорность клещей варьировалась от 0,3% в точке 8 (пос. Гомсельга) до 1,7% в точке 7 (Ботанический сад г. Петрозаводск).

Выделение вируса клещевого энцефалита

Пробы, положительные в ПЦР, использовали для интрацеребрального заражения 2-4х дневных сосунков мышей линии ICR и заражения культуры клеток СПЭВ. Для изоляции вируса было использовано 7 вируссодержащих суспензий клещей *I. persulcatus*. Все штаммы хорошо изолировались на культуре клеток СПЭВ и в мозге сосунков.

При проведении филогенетического анализа использовали последовательности РНК 123 штаммов ВКЭ из GenBank и 7 штаммов, описанных в данной работе. Анализ проводили по участку генома, кодирующему белок Е (1109 нт). Все штаммы, описанные в данной работе, были отнесены к балтийской группе сибирского подтипа ВКЭ и образовывали две монофилетические группы (Рисунок 14). Первая монофилетическая группа образовывалась штаммами из Карелии и штаммами, выделенными на территории Эстонии. Вторая монофилетическая группа – со штаммами, выделенными только на территории республики Карелия.

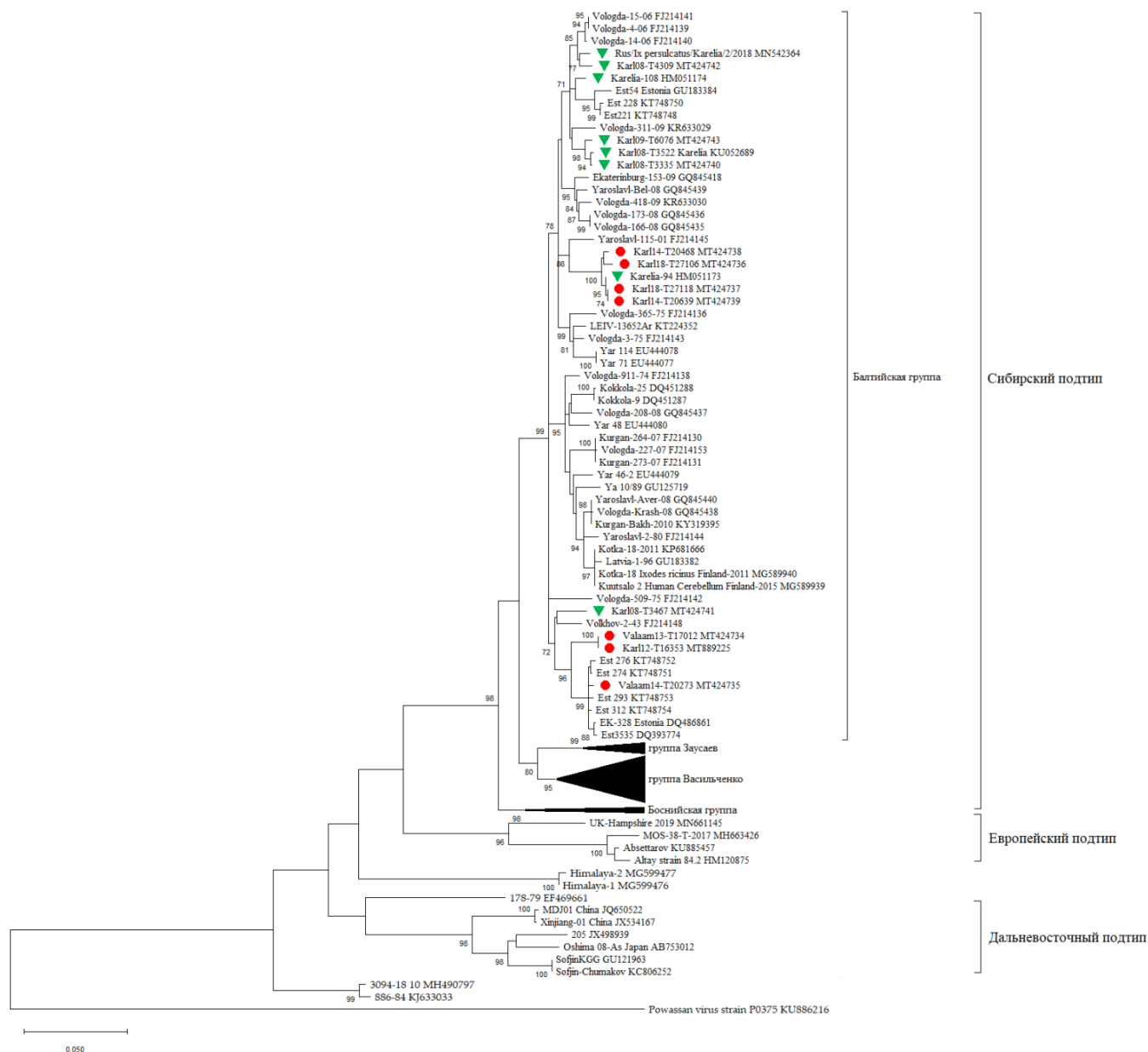


Рисунок 14 – Филогенетическое дерево ВКЭ построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) по участку генома, кодирующего фрагмент белка Е. Штаммы, описанные в данной работе, отмечены красным кругом. Штаммы, выделенные другими авторами – зеленым треугольником.

3.2.2.2 Флавиподобные вирусы

Выявление флавиподобных вирусов

Клещи в количестве 1963 особей были исследованы на наличие РНК флави- и флавиподобных вирусов с помощью праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 – панфлави (сFD2 и MAMD). Была выявлена одна положительная проба. Секвенирование участка генома показало её принадлежность к вирусу Алонгшан. Нами были подобраны специфические праймеры на фрагмент сегмента 2 (Miass_gly_3F и Miass_gly_3R) и с их помощью было исследовано 695 *I. persulcatus* и 25 *I. ricinus*, из

ранее исследованных с помощью панфлави праймеров, и было дополнительно выявлено 9 ампликонов вируса Алонгшан в клещах *I. persulcatus* (Таблица 8). Все ампликоны были обнаружены в клещах, собранных в точке 8 (Рисунок 13). Секвенирование участка генома сегмента 2 показало их принадлежность к вирусу Алонгшан. Вирусофорность клещей составила 0,8% (Таблица 9).

Таблица 8 – Штаммы или ампликоны вируса Алонгшан выделенных («ш») или детектированных («а») в клещах из Республики Карелия [158]

Штамм («ш»)/ ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
a. Goms12-T16338	<i>I. persulcatus</i>	2012, Республика Карелия (62,0690667°, 33,96141667°)	MW525286
a. Goms13-T17158	<i>I. persulcatus</i>	2013, Республика Карелия (62.069381°, 33.964528°)	MW525287
a. Goms13-T17160/2	<i>I. persulcatus</i>		MW525288
a. Goms13-T17182/2	<i>I. persulcatus</i>	2013, Республика Карелия (62.068557°, 33.962730°)	MW525289
a. Goms13-T17190/2	<i>I. persulcatus</i>		MW525290
ш. Galozero-14-T20426	<i>I. persulcatus</i>	2014, Республика Карелия (62.075051°, 33.951404°)	MN604229
a. Goms14-T20532	<i>I. persulcatus</i>	2014, Республика Карелия (62.063838°, 33.943815°)	MW525291
a. Goms18-T27349	<i>I. persulcatus</i>	2018, Республика Карелия (62.075230°, 33.946687°)	MW525292
a. Goms18-T27350	<i>I. persulcatus</i>		MW525293
a. Goms18-T27366	<i>I. persulcatus</i>	2018, Республика Карелия (62.067203°, 33.933651°)	MW525294

Мы использовали следующие определения: «штамм» («ш») – вирус, который прошел несколько пассажей, или постоянно персистирующий в клеточных линиях, что привело к созданию вирусной популяции со стабильными свойствами в заданных лабораторных условиях, «ампликон» («а») – первичный материал, содержащий фрагменты вирусной РНК с определенной нуклеотидной последовательностью без выделения штамма.

Таблица 9 – Зараженность клещей вирусом Алонгшан в республике Карелия

Вид клеща	Количество проанализированных клещей (всего)	Количество проанализированных пулов	Количество положительных пулов	МУЗ ¹ (%)
<i>I. persulcatus</i>	1265	265	10	0,8

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

$$^1 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

Выделение флавиноподобных вирусов

Для выделения вируса была использована культура клеток IRE/CTVM19. После заражения штаммом Galozero-14-T20426 культура клеток содержалась при 28°C. Штамм Galozero-14-T20426 успешно персистировал в культуре клеток более 6 месяцев, не вызывая цитопатического эффекта.

3.2.3 Калининградская область

Самый западный регион России. На юге регион граничит с Польшей, на севере и востоке - с Литвой.

Территория Калининградской области относится к зоне смешанных хвойно-широколиственных лесов. Около 1/5 всей территории занято лесами, состоящими преимущественно из хвойных и широколиственных пород - ели, сосны, дуба, граба и бука, 1/3 площади области занята лугами и пастбищами.

Для области характерен мягкий, влажный климат, который обусловлен её географическим положением и является переходным от морского к умеренно-континентальному. Влияние Балтийского моря приводит к тому, что среднегодовые температуры увеличиваются с 6,5°C на северо-востоке области до 7,5°C на юго-западе. Обычно самый холодный месяц – январь. Самый тёплый месяц – июль. Максимальная температура воздуха летом составляет 22–26 °C, минимальная температура зимой – от –18 до –23 °C. Рельеф области – всхолмленная равнина, отдельные участки которой находятся ниже уровня моря [71].

Сбор клещей проводили в августе 2017 и мае 2018 годов на флаг с растительности (Рисунок 15). Видовой и численный состав исследованных клещей представлен в Таблице 10. Всего было собрано более 1000 клещей и исследовано 188 клещей *I. ricinus*.

Таблица 10 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Калининградской области

Данные места сбора		Клещи	Способ сбора флаг/животное
Широта	Долгота	<i>I. ricinus</i>	
54.97020°	20.50458°	7♂, 18♀	флаг
54.972030°	20.508669°	12♀	флаг
54.97070°	20.51055°	4♂, 4♀	флаг
54.93384°	20.50463°	6♂	флаг
55.089330°	20.733026°	5♀	флаг

55.14493°	20.81964°	4♂	флаг
55.179051°	20.863502°	4♀	флаг
55.18242°	20.85957°	5♂, 5♀	флаг
55.17862°	20.84944°	11♂, 10♀	флаг
55.222354°	20.891556°	4♂, 15♀	флаг
55.175897°	20.846458°	8♀	флаг
54.960614°	20.503409°	14♂	флаг
55.1591837°	20.8432753°	21♀	флаг
55.15465°	20.82790°	3♂, 9♀	флаг
55.183363°	20.857993°	2♀	флаг
55.1525197°	20.8441098°	8♂, 5♀	флаг
55.23387°	20.92020°	4♀	флаг
Итого:		66♂, 122♀	флаг

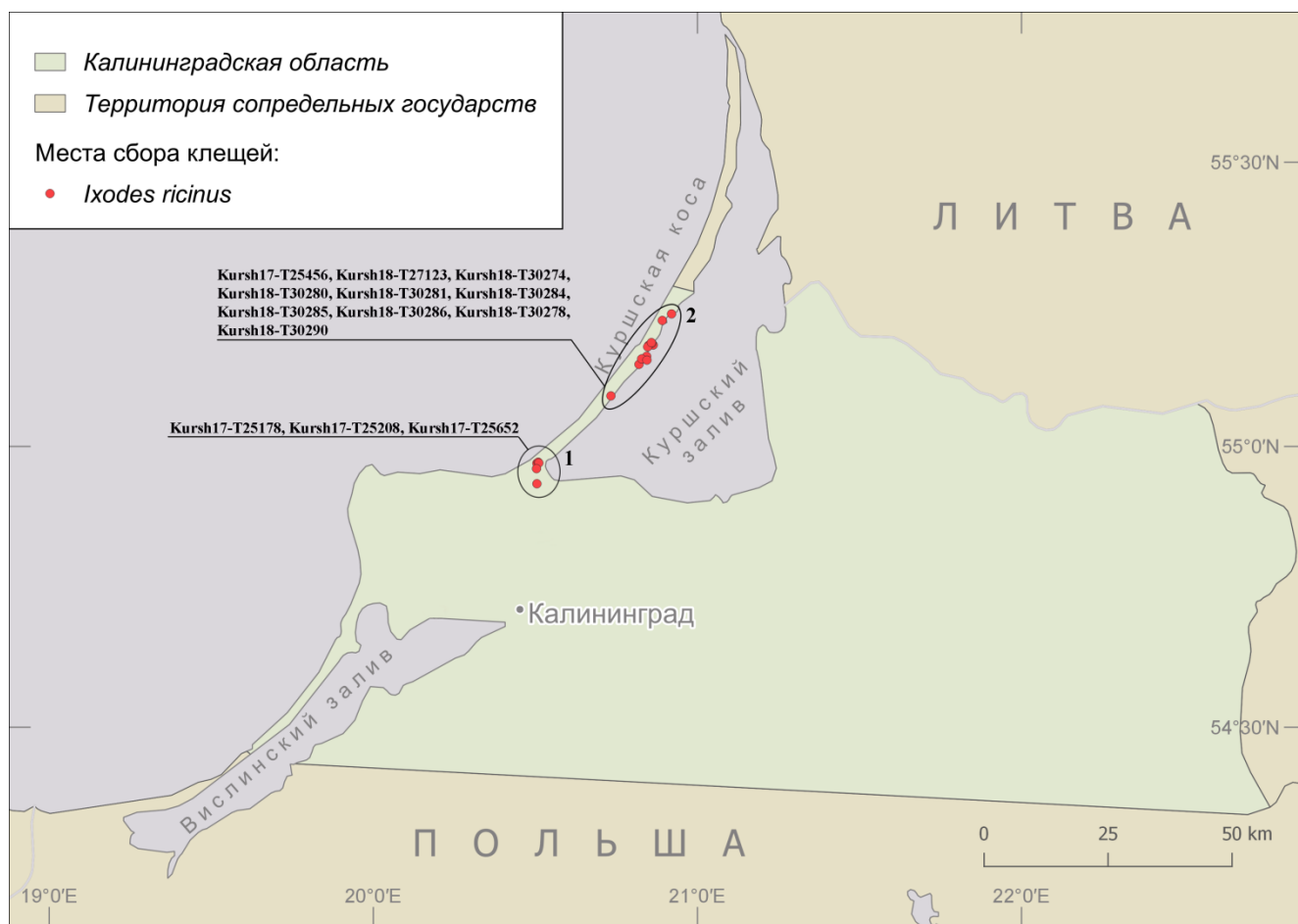


Рисунок 15 – Места сбора клещей и выявления вируса Алонгшан в Калининградской области

3.2.3.1 Флавивирусы

Клещи были исследованы пулами на наличие РНК флавивирусов с помощью панфлави праймеров. РНК флавивирусов не была обнаружена.

3.2.3.2 Флавиподобные вирусы

Исследование клещей с помощью специфических праймеров на вирус Алонгшан Miass_gly_3F и Miass_gly_3R (Таблица 1) выявил 13 положительных пулов (Таблица 11). Секвенирование ампликонов показало их принадлежность к вирусу Алонгшан. Вирусофорность клещей варьировалась от 5,1% в точке 1 до 7,8% в точке 2 (Таблица 12, Рисунок 15).

Таблица 11 – Ампликоны вируса Алонгшан, детектированные в клещах из Калининградской области [158]

Ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
a. Kursh17-T25178	<i>I. ricinus</i>	2017, Калининградская область (54.972030°, 20.508669°)	MW525297
a. Kursh17-T25208	<i>I. ricinus</i>		MW525298
a. Kursh17-T25456	<i>I. ricinus</i>	2017, Калининградская область (55.18242°, 20.85957°)	MW525299
a. Kursh17-T25652	<i>I. ricinus</i>	2017, Калининградская область (54.97020°, 20.50458°)	MW525300
a. Kursh18-T30280	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.146110°, 20.824530°)	MW525304
a. Kursh18-T30274	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.15465°, 20.82790°)	MW525302
a. Kursh18-T27123	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.183363°, 20.857993°)	MW525301
a. Kursh18-T30281	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.175897°, 20.846458°)	MW525305
a. Kursh18-T30284	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.1591837°, 20.8432753°)	MW525306
a. Kursh18-T30285			MW525307
a. Kursh18-T30286			MW525308
a. Kursh18-T30278	<i>I. ricinus</i>	2018, Калининградская область (55.222354°, 20.891556°)	MW525303
a. Kursh18-T30290			MW525309

Таблица 12 – Зараженность клещей вирусом Алонгшан в Калининградской области

Точка на карте ¹	Вид клеща	Количество проанализированных клещей (всего)	Количество проанализированных пулов	Количество положительных пулов	МУЗ ² (%)
1	<i>I. ricinus</i>	59	14	3	5,1
2		129	30	10	7,8

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

¹ точки представлены на Рисунке 15

$$^2 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

Зараженность клещей *I. ricinus* вирусом Алонгшан статистически достоверно выше, чем ВКЭ (критерий Хи-квадрат).

3.2.4 Ставропольский край

Ставропольский край расположен в юго-западной части России - в центральной части Предкавказья и на северном склоне Большого Кавказа. Климат континентальный; зима на равнинах мягкая, снежный покров неустойчив, средняя температура января от -4°C до -10°C (в горах). Лето на равнине очень теплое, средняя температура июля от +22°C до +25°C. В горах лето прохладнее. Осадков выпадает: на равнине 300-500 мм в год, в предгорьях – свыше 600 мм. На территории края обитают более 20 видов клещей [80]. На территории Ставропольского края никогда не регистрировали случаи незавозного КЭ.

Сбор клещей проводили сотрудники Роспотребнадзора Ставропольского края с животных и на флаг. В лабораторию были предоставлены клещевые суспензии 968 клещей 8 видов: *Haem. punctata*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. scupense*, *H. marginatum*, *Rh. rossicus*, *Rh. sanguineus*, *I. ricinus* объединенные в пулы, положительные на наличие антигена ВКЭ в ИФА. Места сбора положительных клещей, видовой и численный состав представлен на Рисунке 16 и в Таблице 13.

Таблица 13 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Ставропольском крае

Данные места сбора		Клещи			Способ сбора флаг/животное
Широта	Долгота	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	
44.107735°	43.264091°	19♀			животное
43.895102°	42.726626°	56♂, 85♀			флаг
45.488461°	41.184730°		4♂, 2♀		животное
45.024704°	41.982376°		1♂, 5♀		животное
44.028835°	43.935219°		1♂		животное
45.454190°	41.035556°		1♂, 1♀		животное
45.483025°	41.216506°		1♂, 1♀		животное
44.235451°	43.121724°		4♂, 12♀		животное
43.866137°	42.747644°		6♂		животное
45.439555°	41.047220°		3♀		животное

45.655817°	41.197900°		1♂, 3♀		животное
44.601316°	41.960214°		15♂, 30♀		животное
45.346224°	41.857286°		2♂, 2♀		животное
43.873866°	42.709235°			10♂, 42♀	животное
44.450204°	42.097278°			4♀	животное
43.903336°	42.712826°			5♀	животное
44.105218°	43.292382°			2♂, 7♀	животное
43.905786°	42.658584°			11♂, 22♀	животное
45.639643°	42.544519°			1♀	животное
44.747925°	43.453882°			1♀	животное
44.443321°	43.133153°			1♂, 2♀	животное
43.866013°	42.747923°			13♂, 10♀	животное
43.874445°	42.710156°			9♀	животное
45.034076°	44.386880°			1♀	животное
45.422797°	41.373202°			11♂, 18♀	животное
45.544169°	41.320893°			5♀	животное
45.497054°	41.212180°			3♂, 6♀	животное
45.570723°	41.021938°			8♂, 4♀	животное
45.836161°	41.516780°			4♀	животное
45.394970°	41.343263°			15♂, 13♀	животное
45.395147°	41.344887°			70♂, 68♀	флаг
44.600068°	41.925142°			7♂, 21♀	животное
44.637751°	41.917067°			3♂, 17♀	животное
44.420595°	42.394630°			5♂, 7♀	животное
Итого:		56♂, 85♀		70♂, 68♀	флаг
		19♀	36♂, 59♀	89♂, 199♀	животное
Широта	Долгота	<i>Ha. punctata</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. marginatum</i>	Способ сбора флаг/животное
43.872368°	42.710562°	2♂, 8♀			животное
44.419586°	42.109615°	5♀			животное
44.442003°	43.134226°	3♂, 24♀			животное
43.868945°	42.751116°	1♂, 21♀			животное
44.367597°	43.706017°	1♂, 5♀			животное
45.348883°	41.856729°	3♀			животное
45.344891°	41.858378°	2♂, 4♀			животное
45.441039°	41.047463°		1♀		животное
45.821667°	43.044855°			12♂, 11♀	животное
45.818366°	43.045379°			3♂, 1♀	животное
44.841848°	43.286457°			37♂, 36♀	животное
45.826965°	42.519903°			6♀	животное
45.098673°	43.464673°			3♀	животное
45.334718°	41.804750°			1♂, 4♀	животное
45.818750°	43.052160°			25♂, 24♀	животное

45.360997°	44.231937°			50♂, 18♀	животное
45.356761°	44.232749°			7♂, 16♀	животное
44.445011°	42.358616°			11♂, 7♀	животное
Итого:		9♂, 70♀	1♀	135♂, 119♀	животное
Широта	Долгота	<i>Rh. rossicus</i>	<i>Rh. sanguineus</i>		Способ сбора флаг/животное
44.223752°	43.194183°	7♂, 15♀			животное
45.381930°	44.202476°	39♂, 23♀			животное
44.314370°	44.192254°		7♂		животное
Итого:		46♂, 38♀	7♂		животное

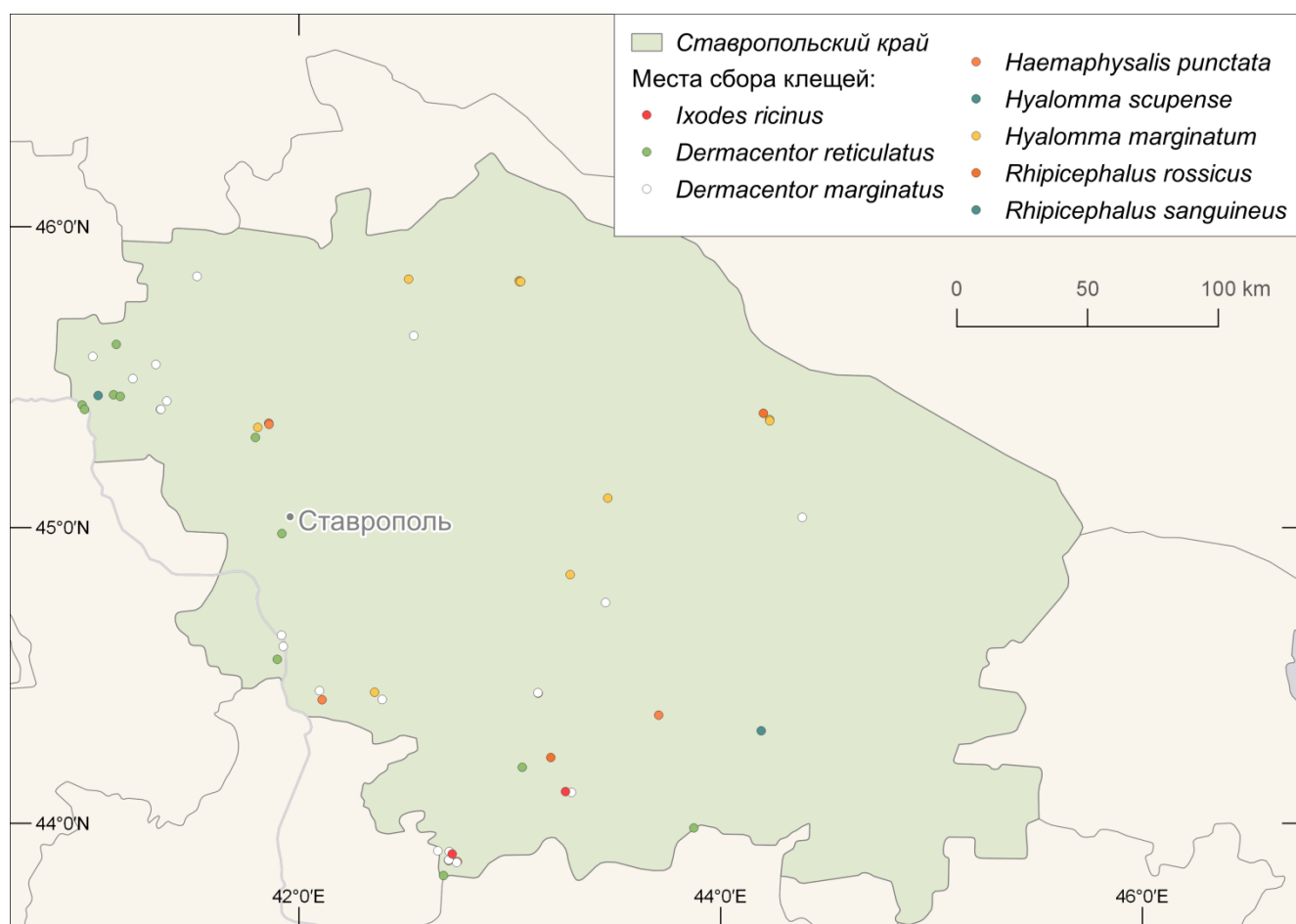


Рисунок 16 – Места сбора клещей в Ставропольском крае

3.2.4.1 Флавивирусы

Пулы были исследованы на наличие РНК ВКЭ с помощью праймеров (Kgg19 и Kgg31) на участок генома, кодирующего фрагмент белка Е. РНК ВКЭ не была детектирована. Отсутствие РНК ВКЭ в клещевых суспензиях, в положительных на наличие антигена ВКЭ в ИФА, ещё раз подтвердило описанные выше данные о возможных ложноположительных реакциях в ИФА.

Мы не обнаружили в клещах РНК вируса Западного Нила и других флавивирусов с помощью панфлави праймеров.

3.2.4.2 Флавиподобные вирусы

Пулы были исследованы на наличие РНК флавиподобных вирусов с помощью панфлави праймеров. Вирусная РНК не была обнаружена.

3.2.5 Челябинская область

Челябинская область располагается в трех природных зонах: горнолесная (горная тайга, хвойные, лиственные и смешанные леса), лесостепная и степная. Климат Челябинской области – континентальный. Зима холодная и продолжительная, лето относительно жаркое с периодическими повторяющимися засухами [77].

В 2014 и 2015 годах было проведено две экспедиции с целью изучения видового состава клещей и наличия в них флавивирусов. Сбор клещей проводили в мае на флаг с растительности в лесных массивах, степных и лесостепных зонах, в местах отдыха населения, а также с домашних животных. Большая часть сборов проводилась в степных районах области (Рисунок 17). Видовой и численный состав исследованных клещей представлен в Таблице 14. Всего было исследовано 1958 клещей.

Таблица 14 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Челябинской области

Данные места сбора		Клещи			Способ сбора флаг/животное
Широта	Долгота	<i>I. persulcatus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	
54.083520°	59.546226°	2♂, 1♀	9♂, 8♀	2♂, 10♀	флаг
54.077678°	59.557866°		3♀	2♀	флаг
54.055812°	59.605618°	1♂, 7♀	2♀	5♂, 12♀	флаг
54.050145°	59.538399°			9♂, 15♀	флаг
54.133333°	59.533333°	1♂		1♂, 7♀	флаг
54.116667°	59.533333°	1♂			флаг
54.124452°	59.546685°	29♂, 30♀	5♀	6♂, 3♀	флаг
53.874638°	59.229960°		5♂, 4♀	30♂, 30♀	животное
53.855183°	59.240433°		22♂, 36♀	33♂, 55♀	флаг
53.880754°	59.241434°			24♂, 48♀	животное
53.857781°	59.242444°		3♀	2♂, 2♀	флаг
53.881783°	59.1628°		50♂, 106♀	18♂, 33♀	флаг
53.881103°	59.163164°		21♂, 45♀	1♂, 2♀	флаг
54.131565°	59.541217°	15♂, 8♀		1♀	флаг
53.674117°	59.731317°		3♂, 1♀	21♂, 25♀	флаг
53.599617°	59.82275°			2♀	флаг

53.524360°	59.799737°			9♂, 27♀	животное
53.5159°	59.775067°		2♂	38♂, 63♀	флаг
53.382567°	59.9295°	1♀	3♂, 8♀	17♂, 22♀	флаг
53.3565°	60.377167°			2♂, 3♀	животное
52.885633°	60.051833°	1♂, 1♀	41♂, 84♀	34♂, 78♀	флаг
52.940933°	59.935533°		4♂, 3♀		флаг
52.053183°	59.957667°		3♂, 3♀	39♂, 91♀	флаг
53.124567°	59.896933°		2♂, 3♀	1♂, 2♀	флаг
53.14555°	59.935283°	4♂	5♂, 4♀	2♀	флаг
53.315983°	60.1329°		1♂		флаг
53.233183°	60.535117°	1♀	2♂, 5♀	1♀	флаг
52.82475°	60.5678°			2♀	флаг
52.428583°	60.306967°			1♀	флаг
52.49865°	60.14015°			5♂, 1♀	животное
52.497667°	60.00035°		11♂, 10♀	10♂, 20♀	флаг
52.47595°	59.871383°		1♂, 13♀	1♂, 5♀	флаг
52.459233°	60.249483°		1♂, 2♀	22♂, 31♀	флаг
52.541683°	60.394067°		1♀		флаг
54.446533°	60.79435°			3♂, 3♀	флаг
54.629017°	60.650567°	1♂, 1♀		3♀	флаг
55.128629°	60.072396°	19♂, 24♀			флаг
55.02145°	60.168283°	12♂, 11♀, 2NN			флаг
55.021061°	60.171371°	63♂, 67♀, 11NN			флаг
54.410216°	62.698490°		21♂, 38♀	11♂, 16♀	флаг
55.021583°	60.169783°	30♂, 42♀, 5NN			флаг
55.01885°	60.165117°	6♂, 5♀	9♂, 8♀	2♂, 10♀	флаг
Итого:		185♂, 199♀, 18NN	202♂, 383♀	274♂, 509♀	флаг
			5♂, 4♀	70♂, 109♀	животное

NN - нимфы

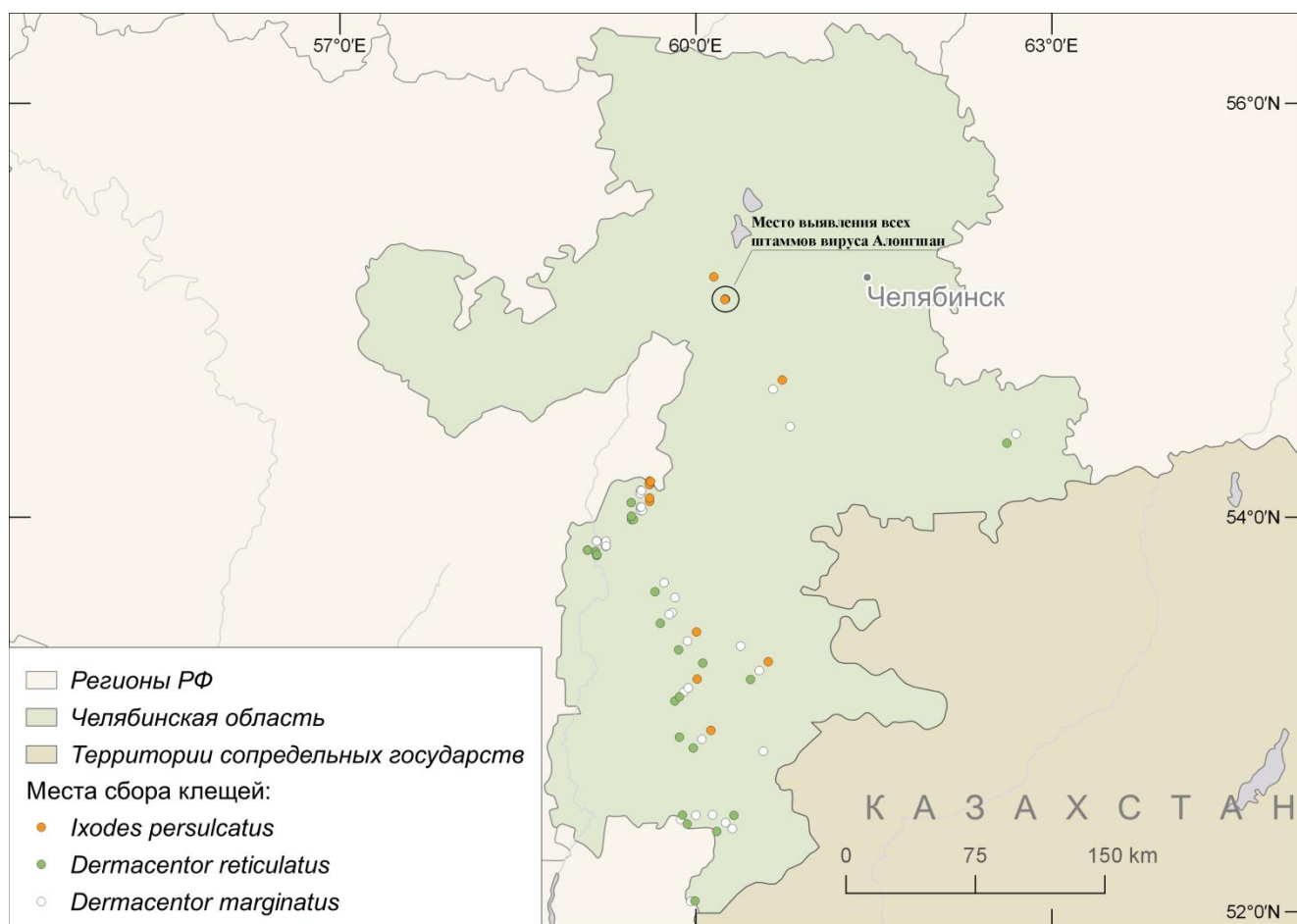


Рисунок 17 – Места сбора клещей и выявления вируса Алонгшан в Челябинской области

3.2.5.1 Флавивirusы

Клещи были исследованы пулами на наличие РНК ВКЭ с помощью праймеров (Kgg19 и Kgg31) на участок генома, кодирующего фрагмент белка Е. РНК ВКЭ не детектирована. Отсутствие РНК ВКЭ в клещах может означать, что в степных и лесостепных районах Челябинской области зараженность клещей *I. persulcatus*, *D. reticulatus* и *D. marginatus* менее 0,25%, 0,17% и 0,1%, соответственно, или циркуляции ВКЭ отсутствует.

Мы не обнаружили в клещах РНК других флавивирусов с помощью панфлави праймеров.

3.2.5.2 Флавиподобные вирусы

Выявление флавиподобных вирусов

Клещи были исследованы пулами и индивидуально на наличие флавивирусной РНК с помощью панфлави праймеров. Было выявлено 11 положительных пулов из клещей *I. persulcatus* (Таблица 15). Секвенирование ПЦР-продукта показало 88,9 – 92,0 % нуклеотидную гомологию всех ампликонов, названных Miass501, Miass502,

Miass506, Miass508, Miass510, Miass 515, Miass519, Miass523, Miass527, Miass15-T22516, Miass15-T22517 с вирусом Алонгшан. Вирусофорность клещей составила 4,3% (Таблица 16).

Таблица 15 – Штаммы или ампликоны вируса Алонгшан, выделенных («ш») или детектированных («а») в клещах из Челябинской области [158]

Штамм («ш»)/ ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
а. Miass501	<i>I. persulcatus</i>	2014, Челябинская область (55.02145°, 60.168283°)	MT210222
ш. Miass502	<i>I. persulcatus</i>		MW525314 – MW525317
ш. Miass506	<i>I. persulcatus</i>		MW525318 – MW525321
а. Miass508	<i>I. persulcatus</i>		MT210221
а. Miass510	<i>I. persulcatus</i>		MT210225
а. Miass515	<i>I. persulcatus</i>		MT210223
ш. Miass519	<i>I. persulcatus</i>		MN648774 – MN648777
а. Miass523	<i>I. persulcatus</i>		MT210224
ш. Miass527	<i>I. persulcatus</i>		MN648770 – MN648773
ш. Miass15-T22516	<i>I. persulcatus</i>	2015, Челябинская область (55.021583°, 60.169783°)	MW525284
ш. Miass15-T22517	<i>I. persulcatus</i>		MW525285

Таблица 16 – Зараженность клещей вирусом Алонгшан в Челябинской области

Вид клеща	Количество проанализированных клещей (всего)	Количество проанализированных пулов	Количество положительных пулов	МУЗ ¹ (%)
<i>I. persulcatus</i>	254	62	11	4,3

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

$$^1 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

Зараженность клещей *I. persulcatus* вирусом Алонгшан статистически достоверно выше, чем ВКЭ.

Изоляция флавиподобных вирусов

Для изоляции вируса была использована культура клеток IRE/CTVM19. После заражения клещевой суспензией, из которой был получен ампликон Miass527, культура

клеток содержалась при 28°C в течение 1 года без субкультивирования. Так как вирус не оказывал ЦПД на клетки, то проводилась только замена среды каждые 14 дней. Каждые 1-2 месяца проводилась проверка наличия вируса в КЖ с помощью специфических праймеров JVsenseV1add – JVasenseV1 и JVsenseV1add – Mi1-2320as (Таблица 1, Рисунок 18). Через год 200 мкл супернатанта была заражена другая пробирка с культурой клеток IRE/CTVM19. Этот пассаж был дважды рассажен в отношении 1:1 в первые 6 месяцев, а потом полученная зараженная культура поддерживалась без субкультивирования в течение 3 лет.

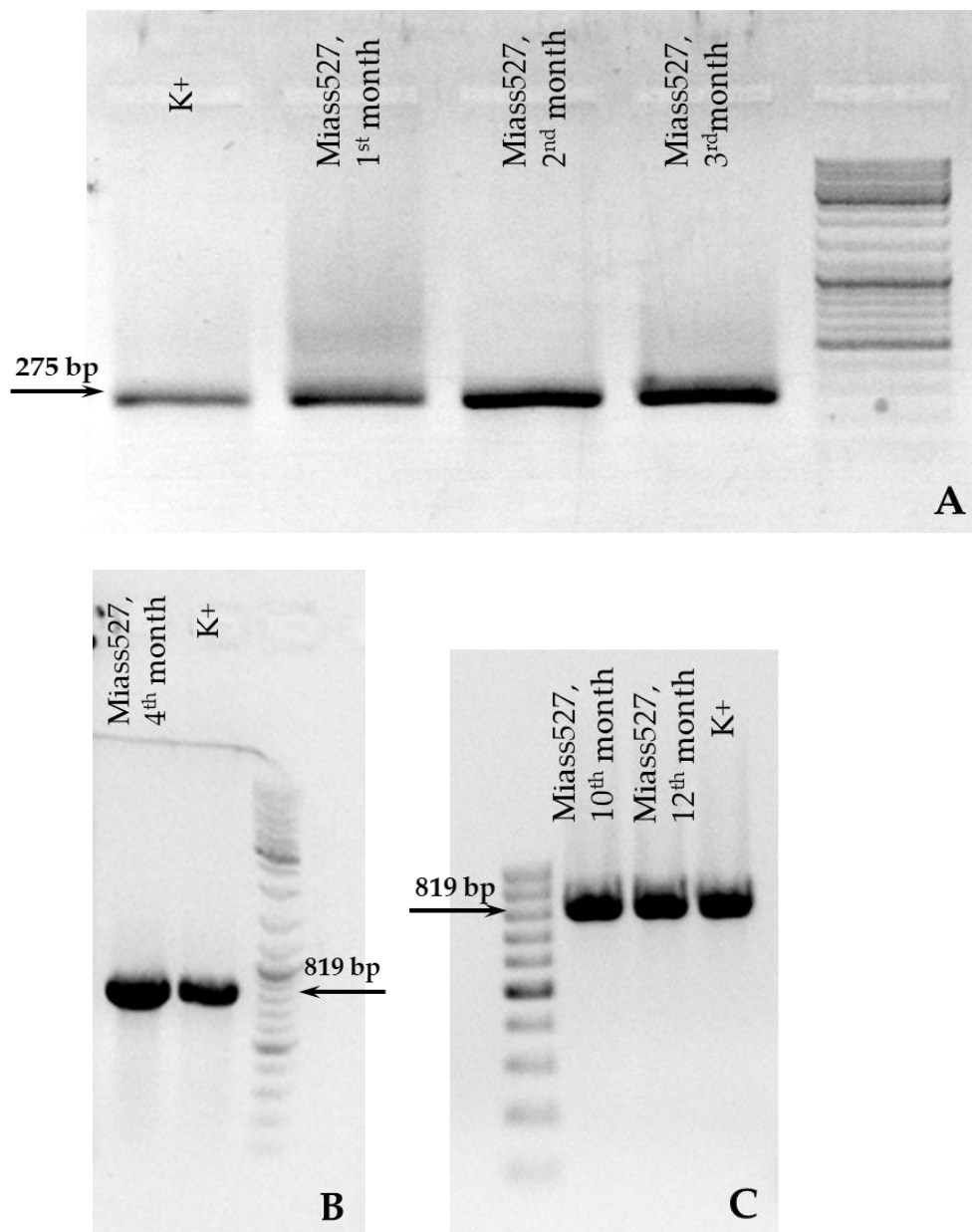


Рисунок 18 – Результаты ПЦР в некоторых контрольных точках для штамма Miass527 вируса Алонгшан, длительно персистировавшего в культуре клеток IRE/CTVM19 [156]. **А.** Результат ПЦР на 1, 2 и 3 месяца персистенции; праймеры JVsenseV1add - JVasenseV1; **В.** Результат ПЦР на 4 месяца персистенции; праймеры JVsenseV1add – Mi1-2320as; **С.** Результат ПЦР на 10 и 12 месяца персистенции; праймеры JVsenseV1add – Mi1-2320as.

Анализ контрольных точек с помощью ПЦР показал, что штамм Miass527 успешно персистирует в культуре клеток клещей в течение 4 лет.

С помощью УЦФ были сконцентрированы 4 штамма вируса Алонгшан: Miass502 (объединенная КЖ, собранная на 1 – 2 месяца после заражения), Miass506 (объединенная КЖ, собранная на 1 – 3 месяца после заражения), Miass519 (объединенная КЖ, собранная на 2 – 3 месяца после заражения) и Miass527 (объединенная КЖ, собранная на 17, 19, 20 и 32 месяца после заражения). Для этих штаммов была определена полная нуклеотидная последовательность генома с помощью ВПС. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома позволило нам подобрать более чувствительные праймеры на вирус Алонгшан. Для других 8 ампликонов была получена нуклеотидная последовательность участка сегмента 1 (NS5) длиной 250 нт.

3.2.6 Республика Татарстан

Территория республики Татарстана представляет собой возвышенную ступенчатую равнину, расчлененную густой сетью речных долин. Широкими долинами Волги и Камы равнина разделена на три части: Предволжье, Предкамье и Закамье. 17% территории республики покрыто лесами, состоящими из деревьев преимущественно лиственных пород (дуб, липа, береза, осина), хвойные породы представлены сосной и елью. Территория Татарстана характеризуется умеренно-континентальным типом климата средних широт, с теплым летом и умеренно-холодной зимой [67].

Клещи были собраны на флаг в мае 2012 года, августе 2014 года и сентябре 2015 года сотрудниками Роспотребнадзора (Рисунок 19). Видовой и численный состав исследованных клещей представлен в Таблице 17. Всего было исследовано: *I. persulcatus* – 116 взрослых особей, *I. ricinus* – 235 взрослых особей и *D. reticulatus* – 137 особей.

Таблица 17 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Республике Татарстан

Данные места сбора		Клещи			Способ сбора флаг/животное
Широта	Долгота	<i>I. persulcatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	
55.389799°	50.752858°	26♂, 34♀		1♂	флаг
55.517200°	51.882729°	31♂, 24♀	28♀	3♂, 6♀	флаг
55.369929°	50.578420°	1♀			флаг
55.922655°	49.178930°		35♂, 20♀	2♂, 6♀	флаг

55.671218°	49.119788°		2♀		флаг
55.237401°	52.009485°			4♂, 10♀	флаг
55.926713°	49.195080°		31♂, 28♀	22♂, 17♀	флаг
55.792462°	52.433137°			10♂, 20♀	флаг
55.836229°	48.958919°		6♂, 15♀	14♂, 16♀	флаг
56.414656°	52.968641°			6♀	флаг
55.85397°	48.7577°		3♂, 19♀		флаг
55.84747°	48.76821°		8♂, 23♀		флаг
55.963800°	49.094880°		10♂, 7♀		флаг
Итого:		57♂, 59♀	93♂, 142♀	56♂, 81♀	флаг



Рисунок 19 – Места сбора клещей и выявления вируса Алонгшан в Республике Татарстан

3.2.6.1 Флавивирусы

Клещи были исследованы пулами на наличие РНК ВКЭ с помощью праймеров (Kgg19 и Kgg31) на участок генома, кодирующего фрагмент белка Е, а также праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 – панфлави (сFD2 и MAMD). РНК ВКЭ не была детектирована. Отсутствие РНК ВКЭ в клещах может означать, что в местах сбора клещей в республике Татарстан зараженность клещей *I. persulcatus*,

I. ricinus и *D. reticulatus* менее 0,9%, 0,4% и 0,7%, соответственно, или циркуляции ВКЭ отсутствует.

3.2.6.2 Флавиподобные вирусы

Клещи были исследованы на наличие РНК флавиподобных вирусов с помощью праймеров на фрагмент генома сегмента 2 (Miass_gly_3F и Miass_gly_3R). Было выявлено одна положительная проба из клещей *I. ricinus* (Таблица 18). Секвенирование участка генома сегмента 2 показало его принадлежность к вирусу Алонгшан. Вирусофорность клещей *I. ricinus* составила 1,4% (Таблица 19).

Таблица 18 – Ампликоны вируса Алонгшан детектированные в клещах из Республики Татарстан [158]

Ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
а. Tat14-T21924	<i>I. ricinus</i>	2014, Республика Татарстан (55.85397°, 48.7577°)	MW525313

Таблица 19 – Зараженность клещей вирусом Алонгшан в Республике Татарстан

Вид клеща	Количество проанализированных клещей (всего)	Количество проанализированных пулов	Количество положительных пулов	МУЗ ¹ (%)
<i>I. ricinus</i>	74	16	1	1,4

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

$$^1 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

3.2.7 Ульяновская область

Ульяновская область расположена на юго-востоке Европейской части России. Река Волга делит Ульяновскую область на возвышенное правобережье и низменное левобережье (Заволжье). Правобережная часть занимает около 3/4 территории и находится в пределах Приволжской возвышенности с вытянутыми вдоль Волги Сенгилеевскими, Ундорскими и Кременскими горами. Левобережная часть представляет собой относительно пологую равнину. Климат умеренно континентальный. Область расположена в зоне лесостепи. Леса занимают 26,3% территории области. Основные лесообразующие породы – сосна, дуб, берёза, осина. Хвойные породы занимают 41,7% от всей лесопокрытой площади. Преобладают

сосново-широколиственные леса, встречаются сосновые леса зеленомошные на песчаных почвах, на вершинах холмистых возвышенностей – сухие сосняки лишайниковые [23].

Сбор клещей проводился сотрудниками Роспотребнадзора в апреле – мае 2014 года и в июле, августе 2015 года на флаг (Рисунок 20). Видовой и численный состав исследованных клещей представлен в Таблице 20. Всего было исследовано 177 клещей.

Таблица 20 – Видовой и численный состав исследованных клещей, собранных в Ульяновской области

Данные места сбора		Клещи				Способ сбора флаг/ животное
Широта	Долгота	<i>I. persulcatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	
54.335019°	48.278900°			10♀		флаг
54.258148°	49.736087°		1♀			флаг
54.180614°	49.382883°			2♂		флаг
54.266489°	49.711704°			2♂, 1♀		флаг
54.266708°	49.712709°	3♂, 1♀				флаг
54.295214°	47.252101°			1♀	1♂	флаг
53.025278°	46.981400°			4♂, 6♀		флаг
53.786425°	46.409684°			3♂, 2♀		флаг
53.811239°	46.295426°			3♂, 2♀		флаг
53.721856°	48.391140°			1♂	1♀	флаг
54.322859°	47.636575°		1♀	1♀		флаг
53.997682°	48.722627°			6♂		флаг
54.693403°	48.180755°				2♀	флаг
53.491635°	47.691051°				3♂, 2♀	флаг
54.588423°	48.416590°		1♂			флаг
54.578392°	46.776101°		1♀			флаг
54.430074°	46.769602°			2♀		флаг
54.352651°	48.848778°			1♂, 1♀		флаг
54.628633°	48.925963°			1♂, 4♀		флаг
54.628984°	48.926714°			4♂, 11♀		флаг
54.494871°	46.716315°			1♀	2♂, 4♀	флаг
54.206611°	48.066107°		1♀			флаг
53.519610°	46.922686°		1♀			флаг
54.58599°	48.41638°		9♂, 3♀			флаг
54.207716°	48.065584°		1♀			флаг
54.599476°	48.427208°		1♂, 1♀			флаг
54.326011°	47.639686°		8♂			флаг
54.572987°	48.324509°		3♂, 3♀, 2NN			флаг
54.21031°	48.06427°		1♀			флаг

54.205522°	48.067472°		1♂, 2♀			флаг
54.32334°	47.64586°		5♂			флаг
Итого:		3♂, 1♀	33♂, 17♀, 2NN	42♂, 54♀	9♂, 16♀	флаг

NN – нимфы

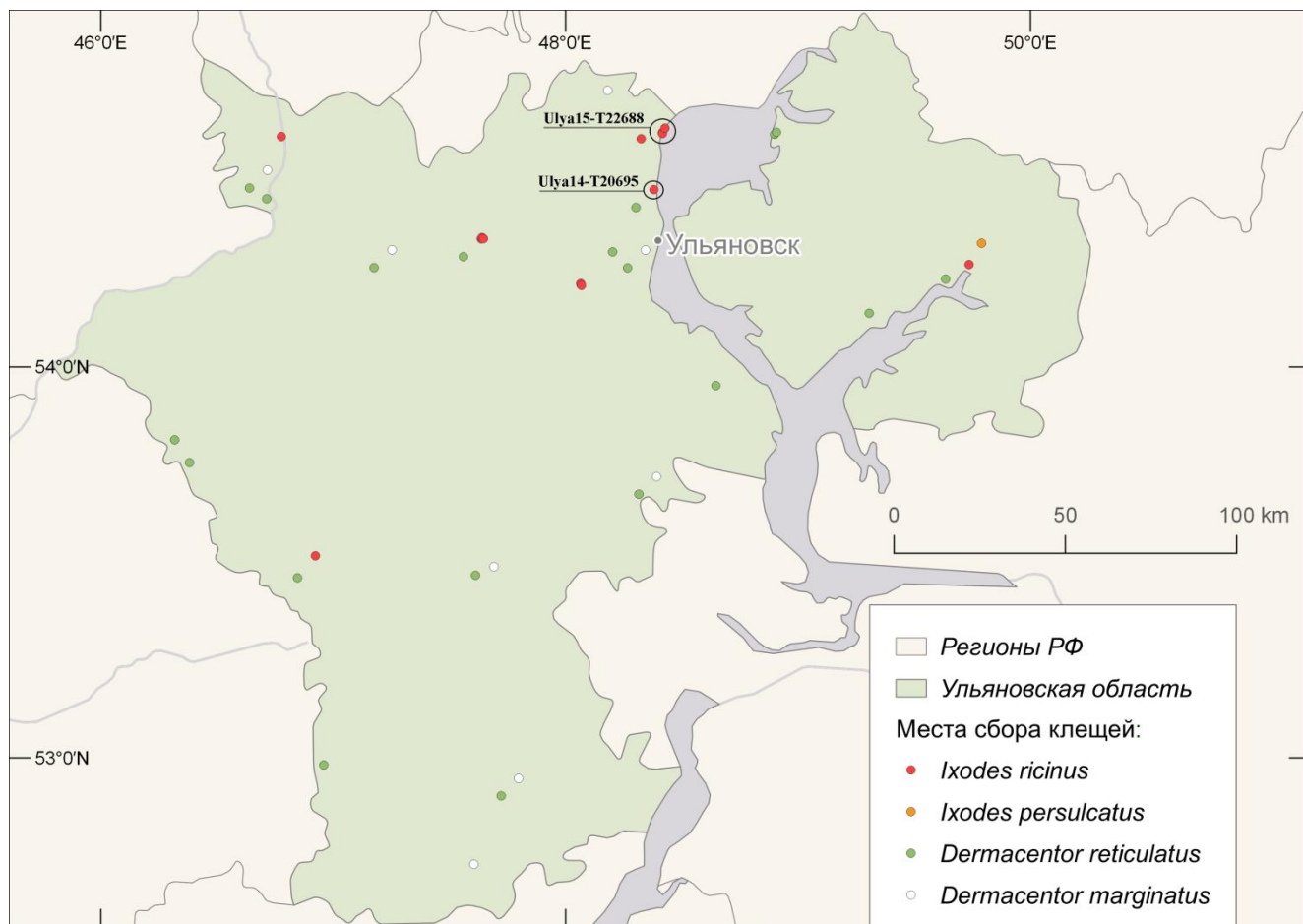


Рисунок 20 – Места сбора клещей и выявления вируса Алонгшан в Ульяновской области

3.2.7.1 Флавивirusы

Клещи были исследованы пулами на наличие РНК ВКЭ с помощью праймеров (Kgg19 и Kgg31) на участок генома, кодирующего фрагмент белка E, а также праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 – панфлави (сFD2 и MAMD). РНК ВКЭ не была детектирована. Отсутствие РНК ВКЭ в клещах может означать, что в местах сбора клещей в Ульяновской области зараженность клещей *I. ricinus*, *D. reticulatus* и *D. marginatus* ВКЭ менее 1,9%, 1% и 4%, соответственно, или циркуляции ВКЭ отсутствует.

3.2.7.2 Флавиподобные вирусы

Клещи были исследованы на наличие РНК флавиподобных вирусов с помощью праймеров на фрагмент генома сегмента 2 (Miass_gly_3F и Miass_gly_3R). Было выявлено две положительные пробы (Таблица 21, 22). Секвенирование участка генома сегмента 2 показало их принадлежность к вирусу Алонгшан.

Таблица 21 – Ампликоны вируса Алонгшан, детектированные в клещах из Ульяновской области

Ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
a. Ulya14-T20695	<i>D. reticulatus</i>	2014, Ульяновская область (54.446204°, 48.379524°)	MW525311
a. Ulya15-T22688	<i>I. ricinus</i>	2015, Ульяновская область (54.588423°, 48.416590°)	MW525312

Таблица 22 – Зараженность клещей вирусом Алонгшан в Ульяновской области

Вид клеща	Количество проанализированных клещей (всего)	Количество проанализированных пулов/индивидуально	Количество положительных пулов/индивидуально	МУЗ ¹ (%)
<i>I. ricinus</i>	20	0/20	0/1	5 ²
<i>D. reticulatus</i>	9	2/0	1/0	11,1 ²

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

$$^1 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}};$$

² Гипотетическое значение, из-за малого количества исследованных клещей

3.2.8 Республика Тыва

Республика Тыва является горным регионом России, на территории которого лишь 20% занимают межгорные котловины. Около половины территории республики занимают горные леса (кедр, лиственница, сосна), при подъеме выше 2200 м над уровнем моря (н.у.м.) леса сменяются горными тундрами, реже – лугами. В котловинах преобладает степная растительность, встречаются участки сосновых лесов.

Территория республики находится в условиях умеренного или недостаточного увлажнения. Распределение осадков по региону чрезвычайно неравномерное - от 150 мм в год в котловинах до 1000 мм в горах. Климат резко континентальный. Зима морозная безветренная, в котловинах малоснежная. Средняя температура января от - 28°C до -

35°C. Лето умеренно теплое в горах и жаркое в котловинах. Средняя температура июля от +15°C до +20°C. Зима длится с ноября по апрель. Снежный покров устанавливается в конце октября и достигает 15-20 см, в горах до 1-2 метров, сходит в середине апреля, в горах – в мае. Весна (апрель – май) – короткая, ясная, ветреная и сухая [72].

В середине 80-х годов прошлого столетия проводилось геоботаническое районирование республики Тыва [42], согласно которому территория республики была разделена на 5 провинций и 12 округов (Рисунок 21).

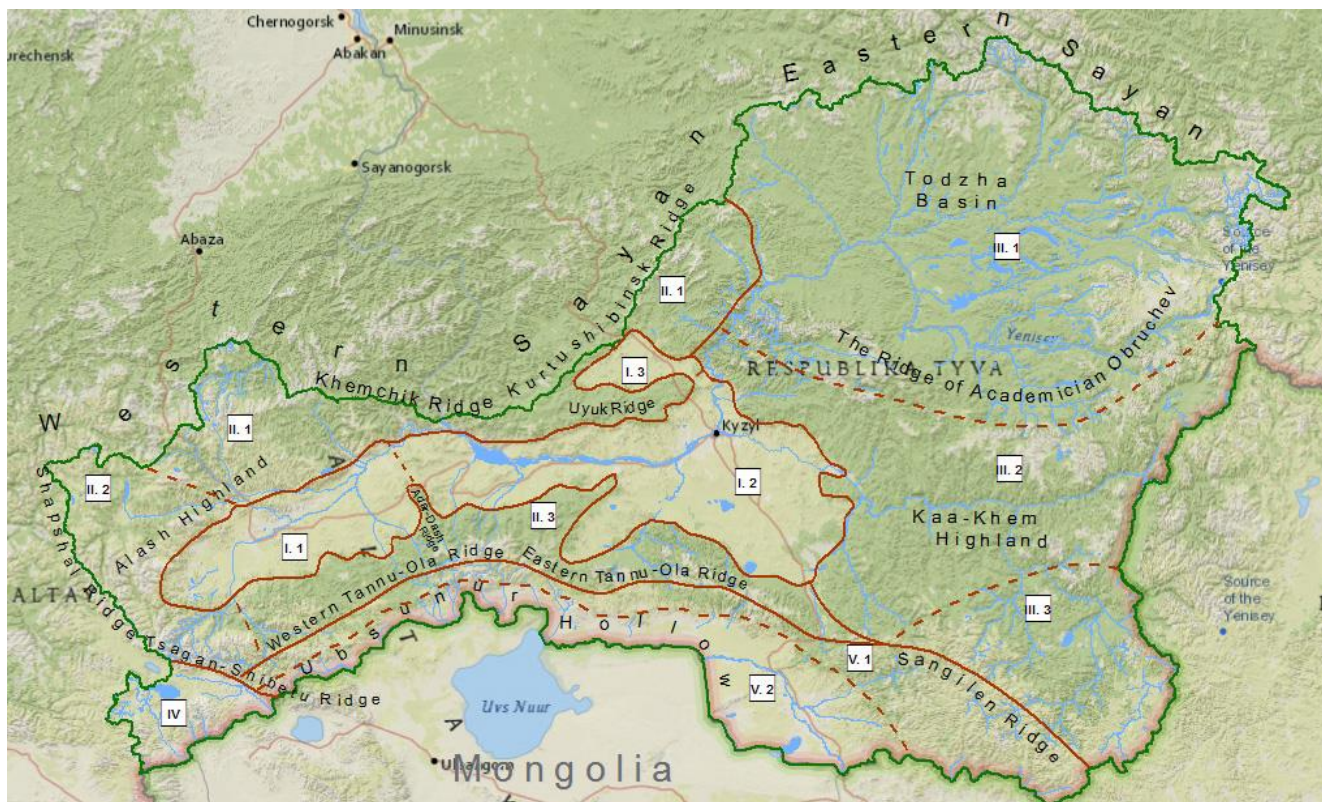


Рисунок 21 – Схема геоботанического районирования Республики Тыва по Маскаеву [42]. I. Тувинская котловинная степная провинция: I.1. – Хемчикский сухостепной округ, I.2. – Центральнотувинский лугово-степной округ, I.3. – Турано-Уюкский лиственный лугово-степной округ; II. Западно-Саянская горная таежная провинция: II.1. – Куртушибинский остепненный кедрово-лиственный округ, II.2. – Верхнехемчикский лиственный остепненный горно-тундровый округ, II.3. – Таннуольский тундровый, остепненный лиственный округ; III. Восточно-Саянская горная таежная провинция: III.1. – Тоджинский кедрово-лиственный округ, III.2. – Восточно-Тувинский горно-тундровый лиственный округ, III.3. – Сангиленский лиственный горно-тундровый округ; IV. Юго-Восточная Алтайская горная степная провинция, Монгун-Тайгинский горно-тундровый опустыненный округ; V. Убсунурская равнинная опустыненно-степная провинция: V.1. – Южно-Таннуольско-Сангиленский степной округ, V.2. – Убсунурский опустыненный степной округ. Границы: ----- -- провинций, - - - - - округов.

При описании иксодофауны мы опирались на естественные географические препятствия, возникающие при передвижении животных-прокормителей. Группировки мест сбора (точка) проводили согласно географическому расположению и геоботаническому районированию республики (Рисунок 22).

С 2008 по 2017 год было проведено 6 экспедиций с целью изучения видового состава клещей и наличия в них возбудителей флавивирусных инфекций. Сбор клещей проводили с начала мая до середины июня (Рисунок 22) на флаг с растительности в лесных массивах высокогорья, среднегорья и низегорья, в долинах и поймах рек, в степных и лесостепных зонах, в местах отдыха населения, а также с домашних животных: коров, овец, собак, лошадей. Видовой и численный состав представлен в Таблице 23.

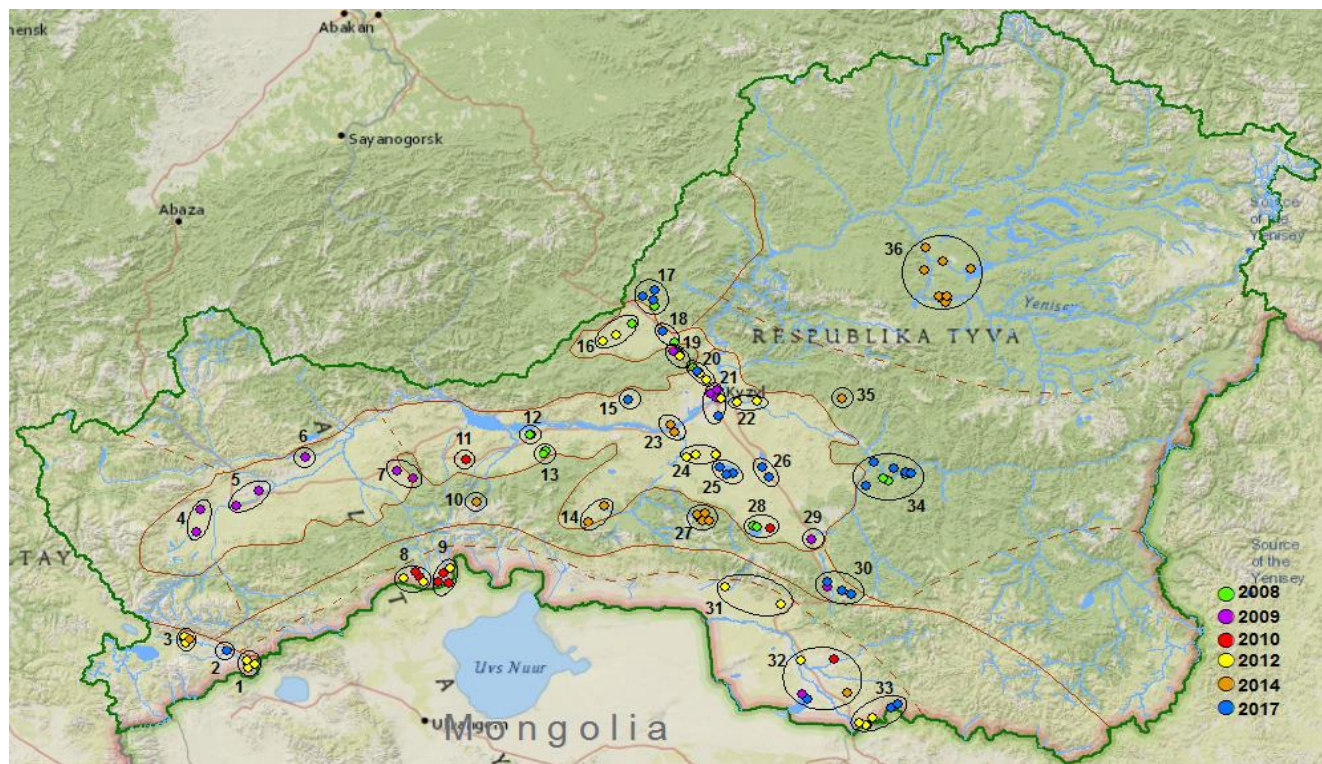


Рисунок 22 – Места сбора клещей в Республике Тыва [157]

Таблица 23 – Видовой и численный состав клещей в точках сбора в Республике Тыва [157]

Точка на карте ¹	<i>I. persulcatus</i>		<i>D. nuttalli</i>		<i>D. silvarum</i>	
	флаг	животные	флаг	животные	флаг	животные
I. Тувинская котловинная степная провинция						
1. Хемчикский сухостепной округ						
4		1♂		3♂, 5♀		
5			2♂, 8♀	1♂		
6			1♀			
7				1♂	1♀	
2. Центральнотувинский лугово-степной округ						
11			2♂, 1♀			
12		7♀				14♂, 11♀
13	18♂, 31♀					
14	2♂					
15			2♂, 1♀			

20	6♂, 3♀		7♂, 10♀		6♂, 6♀	
21			1♂, 3♀	22♂, 4♀		
22			8♂, 15♀	30♂, 15♀		
23	4♂, 5♀					
24			4♂, 4♀			
25			134♂, 192♀			
26			8♂, 16♀			
28	2♂, 2♀			2♂, 9♀		23♂
29	1♂					
<i>3. Турано-Уюкский лиственничный лугово-степной округ</i>						
16			47♂, 61♀		2♀	
18	18♂, 15♀		3♀			
II. Западно-Саянская горная таежная провинция						
<i>1. Куртушибинский остепненный кедрово-лиственничный округ</i>						
17	10♂, 11♀					
19	75♂, 69♀, 2NN		1♀			
<i>3. Таннуольский тундровый, остепненный лиственничный округ</i>						
10	56♂, 57♀					
27	24♂, 16♀					
30	3♂, 7♀					
III. Восточно-Саянская горная таежная провинция						
<i>1. Тоджинский кедрово-лиственничный округ</i>						
36	1♂	1♀	2♂, 3♀	3♀	2♂, 6♀	11♀
<i>2. Восточно-Тувинский горно-тундровый лиственничный округ</i>						
34	198♂, 149♀, 13NN				1♀	
35		1♂, 1♀				
IV. Юго-Восточная Алтайская горная степная провинция						
<i>Монгун-Тайгинский горно-тундровый опустыненный округ</i>						
1				191♂, 178♀		
2			21♂, 66♀, 4NN			
3			7♂, 22♀	40♂, 34♀, 5NN		
V. Убсунурская равнинная опустыненно-степная провинция						
<i>2. Убсунурский опустыненный степной округ</i>						
8			4♂, 25♀	107♂, 60♀		
9			50♂, 121♀	105♂, 83♀		
31			7♂, 8♀	5♂, 5♀		
32			46♂, 64♀	83♂, 66♀		2♂
33			48♂, 103♀	2♂, 17♀		
Итого:	418♂, 365♀, 15NN	2♂, 9♀	400♂, 728♀, 4NN	592♂, 479♀, 5NN	8♂, 16♀	39♂, 22♀

¹ точки представлены на Рисунке 22.

NN - нимфы

3.2.8.1 Флавивирусы

Выявление вируса клещевого энцефалита

Клещей исследовали на наличие ВКЭ индивидуально и пулами с помощью ПЦР с использованием праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка Е, а также ПЦР-РВ с использованием коммерческого набора «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»). РНК вируса была найдена в клещах, собранных в следующих округах: Убсунурский опустыненный степной (точки 9, 32), Восточно-Тувинский горно-тундровый лиственничный (точка 34), Куртушибинский остепненный кедрово-лиственничный (точки 17, 19), Таннуольский тундровый остепненный лиственничный (точка 10), Хемчикский сухостепной (точки 4, 5), Центральнотувинский лугово-степной (точки 13, 20, 28), Турано-Уюкский лиственничный лугово-степной (точка 18) (Рисунок 22, Таблица 24). РНК ВКЭ не была детектирована в клещах из Монгун-Тайгинского горно-тундрового опустыненного и Тоджинского кедрово-лиственничного округов. Из Монгун-Тайгинского округа было проанализировано 560 клещей *D. nuttalli*. Отсутствие вируса в таком количестве клещей может означать, что зараженность клещей менее 0,2% или отсутствие циркуляции ВКЭ вообще на территории округа. Из Тоджинского округа было проанализировано всего 29 особей, и тот факт, что мы не выявили в них РНК ВКЭ, может быть следствием сбора малого количества особей и/или их зараженности вирусом менее 3,5%.

В некоторых округах количество проанализированных на зараженность ВКЭ клещей было недостаточно для того, чтобы судить о вирусофорности. В связи с этим, зараженность клещей мы рассчитывали только для тех точек, где было проанализировано более 20 клещей.

Почти во всех точках, где было собрано достаточное количество *I. persulcatus*, мы находили РНК ВКЭ в клещах этого вида. Зараженность *I. persulcatus* колебалась от 0,9% в точке 10 до 4,76% в точке 17 (Таблица 24).

Клещи *D. silvarum* в количестве более 20 особей были собраны в точках 12 (25 клещей) и 28 (23 клеща). В клещах из точки 12 ВКЭ обнаружен не был. При анализе клещей из точки 28 РНК ВКЭ была обнаружена в двух особях, что составило 8,6%. Зараженность *D. silvarum* статистически не отличается от зараженности *I. persulcatus*,

как внутри одного округа (Центральнотувинский лугово-степной округ), так и в общем, по Республике (критерий Хи-квадрат, $p > 0,05$).

Клещи *D. nuttalli* были собраны практически во всех округах. Зараженные особи были найдены в Хемчикском сухостепном округе (точки 4 и 5) и Убсунурском опустыненном степном округе (точки 9 и 32). Количество особей, достаточное для определения зараженности, было собрано только в точках 9 и 32, где она составила 5,2% и 8,3%, соответственно. Зараженность *D. nuttalli* статистически не отличалась от таковой у *I. persulcatus* и *D. silvarum* (критерий Хи-квадрат, $p > 0,05$).

Разницы между зараженностью клещей *I. persulcatus* в зонах совместного обитания с клещами рода *Dermacentor* и зараженностью *I. persulcatus* в районах абсолютного доминирования этих клещей выявлено не было. Различий между зараженностью клещей из разных геоботанических провинций выявлено не было.

ВКЭ встречался на всех высотах. Корреляции между зараженностью клещей и высотой места сбора не наблюдалась. Самая высокая точка, где был найден ВКЭ в клещах рода *Dermacentor*, – 1566 м н.у.м. (точка 32), а в клещах *I. persulcatus* – 1506 м н.у.м. (точка 19).

Таблица 24 – Распространенность вируса клещевого энцефалита на территории республики Тыва [157]

Точка на карте ¹	Вид клеща	Высота сбора, м	Кол-во проанализированных клещей (всего)	Кол-во проанализированных пулов/индивидуально	Кол-во положительных проб	Штамм ВКЭ	номер GenBank	МУЗ ² (%)
4	<i>I. persulcatus</i>	950 – 1050	1	0/1	0			0 ^в
	<i>D. nuttalli</i>		8	0/8	3			37,5 ³
5	<i>D. nuttalli</i>	811 – 854	11	0/11	6			54,5 ³
9	<i>D. nuttalli</i>	1520	96	21/30	5			5,2
10	<i>I. persulcatus</i>	914	113	29/0	1	TV14-T20214	MH746802	0,9
13	<i>I. persulcatus</i>	712	49	10/0	2	TV08-T2540 TV08-T2546	MH614278 KU052690	4
17	<i>I. persulcatus</i>	900	21	4/5	1	TV08-T2513	MH614281	4,76
18	<i>I. persulcatus</i>	799 - 900	33	9/1	1	TV17-T24686	MH614282	3,03
	<i>D. nuttalli</i>		3	1/0	0			0 ³
19	<i>I. persulcatus</i>	1538,7	144	40/45	3	TV09-T4929 TV17-T24679	MH614279 MH614285	2,08
	<i>D. nuttalli</i>		1	0/1	0			0 ³
20	<i>I. persulcatus</i>	968 – 1067	9	4/1	1	TV08-T2510	MH614277	11,1 ³
	<i>D. nuttalli</i>		17	6/1	0			0 ³

	<i>D. silvarum</i>		12	4/2	0			0 ³
28	<i>I. persulcatus</i>	1031	4	0/4	1			25 ³
	<i>D. silvarum</i>		23	6/0	2	TV08-T2515	MK411539	8,6
32	<i>D. nuttalli</i>	1087 - 1566	205	51/43	17	TV17-T25121/1	MH614283	8,3
	<i>D. silvarum</i>		2	0/2	0			0 ³
34	<i>I. persulcatus</i>	800	348	73/12	4	TV08-T2508	MH614276	1,15
						TV08-T2460	MH614280	
						TV17-T24714	MH614286	
						TV17-T24615	MH614284	

В таблице приведены данные только для тех сборов, в которых были обнаружены положительные образцы.

¹ точки представлены на Рисунке 22.

$$^2 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}};$$

³ Гипотетическое значение, из-за малого количества исследованных клещей

Выделение вируса клещевого энцефалита

Пробы положительные в ПЦР и ПЦР-РВ использовали для интрацеребрального заражения 2-4 дневных сосунков мышей ICR и заражения культуры клеток СПЭВ и Vero. Для изоляции вируса было использовано 14 ампликон содержащих суспензий клещей *I. persulcatus*, и было изолировано 9 штаммов (64% изоляции). Для изоляции вирусов из клещей рода *Dermacentor* было использовано 33 ампликон содержащих суспензии, и был изолирован только 1 штамм ВКЭ (3% изоляции) (Таблица 25).

Таблица 25 – Результаты изоляции ВКЭ из клещевых суспензий, положительных на наличие вирусной РНК

Вид клеща	Количество положительных проб в ПЦР и ПЦР-РВ	Пассажи, количество полученных штаммов или изолятов / количество исследованных образцов		
		СПЭВ/Vero	Мыши	СПЭВ/Vero+Мыши
<i>I. persulcatus</i>	ПЦР – 14	-	3/5	6/9
<i>D. nuttalli</i>	ПЦР – 19	0/9	-	0/8
	ПЦР-РВ – 12	0/5	-	1/7
<i>D. silvarum</i>	ПЦР – 2	-	-	1/2

ПЦР – использовали праймеры на фрагмент генома, кодирующего белое Е (Kgg19 и Kgg31); ПЦР-РВ – использовали набор «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»).

Для 10 штаммов была определена нуклеотидная последовательность части генома (С, ргМ, Е, NS1, NS2a, NS2b). При проведении филогенетического анализа использовали последовательности РНК 123 штамма ВКЭ из GenBank и 10 штаммов, выделенных в Тыве. Нами было показано, что при филогенетическом анализе по участку гена, кодирующему белок Е, штаммы/ампликоны сибирского подтипа делятся на четыре группы: балтийская, Васильченко, Заусаев и обская [117]. Что также было показано при филогенетическом анализе, проведенном по полному геному, где штаммы были разделены на пять подгрупп: балтийская, Васильченко, Заусаев, обская и Босния [233]. Все штаммы, описанные в работе, отнесены к группе Васильченко сибирского подтипа ВКЭ и совместно с 4 штаммами, выделенными в Тыве в 2011 г. [44], образовывали одну монофилетическую группу (Рисунок 23). Другие 3 штамма, выделенные на территории республики Тыва теми же авторами, образовывали общую группу со штаммами, выделенными в Кемеровской области и Китае.

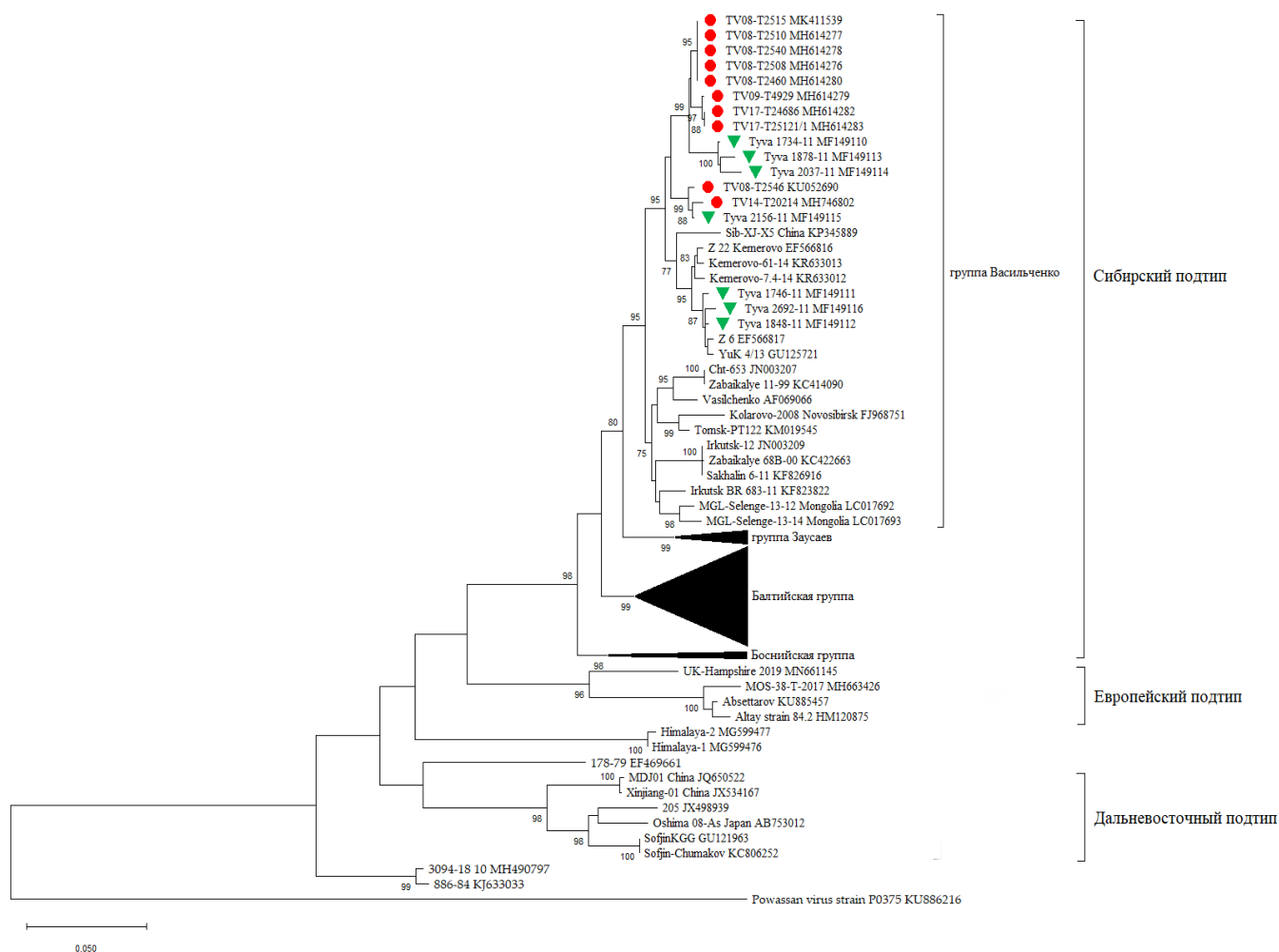


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево вируса клещевого энцефалита построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) по фрагменту генома, кодирующего белок Е. Штаммы, описанные в данной работе, отмечены красным кругом. Штаммы, выделенные другими авторами – зеленым треугольником

3.2.8.2 Флавиподобные вирусы

Выявление флавиподобных вирусов

Те же клещевые суспензии были исследованы на наличие других флави- и флавиподобных вирусов с использованием праймеров на род *Flavivirus* – панфлави. РНК флавивируса была обнаружена в клещах, собранных в Восточно-Тувинском горно-тундровом лиственничном округе (точка 34) и в Убсунурском опустыненном степном округе (точка 32) (Таблица 26).

Секвенирование участка генома показало их принадлежность к вирусам Алонгшан (точка 34) и Янгтоу (точка 32).

Таблица 26 – Распространенность флавиподобных вирусов на территории республики Тыва

Точка на карте ¹	Вид клеща	Кол-во проанализированных клещей (всего)	Кол-во проанализированных пулов/индивидуально	Кол-во положительных проб	Штаммы	МУЗ ² (%)
вирус Янггоу						
32	<i>D. nuttalli</i>	205	51/43	1	Erzin14-T20074	0,5
	<i>D. silvarum</i>	2	0/2	0		0
вирус Алонгшан						
34	<i>I. persulcatus</i>	348	73/12	2	Erjey17-T25134	0,6
					Sizim17-T25125	

¹ точки представлены на Рисунке 22;

$$^2 \text{МУЗ} = \frac{\text{ПП} + \text{ПК}}{\text{ИК}}.$$

Вирус Алонгшан был выявлен нами только в клещах *I. persulcatus*, и их зараженность составила 0,6%. Вирус Янггоу был выявлен только в клещах *D. nuttalli*, и их зараженность составила 0,5%.

Точка 32 является сочетанным очагом ВКЭ и вируса Янггоу. Зараженность клещей *D. nuttalli* ВКЭ статистически выше зараженности этих клещей вирусом Янггоу (критерий Хи-квадрат). Точка 34 является сочетанным очагом ВКЭ и вируса Алонгшан. Зараженность клещей *I. persulcatus* ВКЭ статистически не отличалась от зараженности вирусом Алонгшан (критерий Хи-квадрат).

Выделение флавиподобных вирусов

Для изоляции вируса были использованы культуры клеток клещей. Штамм Erjey17-T25134 вируса Алонгшан размножался в культуре клеток IRE/CTVM19. Ампликон Sizim17-T25125 вируса Алонгшан не размножался в культуре клеток IRE/CTVM19. Штамм Erzin14-T20074 вируса Янггоу размножался в культурах клеток IRE/CTVM19 и HAE/CTVM8.

3.2.9 Обсуждение

Экология арбовирусов является подвижной системой, зависящей от многих биотических и абиотических факторов. В связи с этим необходимо иметь определенные

временные срезы эпидемиологической и эпизоотологической обстановки, чтобы можно было проследить влияние разных факторов.

В период с 2008 года по 2019 год в различных регионах Российской Федерации нами было проанализировано на наличие флавивирусов 7122 клещей 12 видов: *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli*, *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*, *Haemaphysalis concinna*, *Ha. punctata*, *Rhipicephalus rossicus* и *Rh. sanguineus*. Большая часть клещей были собраны на южной границе распространения ВКЭ.

В республике Карелии систематический учет заболеваемости населения КЭ проводится с 1957 года и на начальном этапе регистрации уровень заболевания был в пределах 0,1 – 2,0 случая на 100 тыс. населения [165]. За период с 1998 по 2013 года в республике было зарегистрировано 744 случая КЭ и среднегодовое значение заболеваемости составило 7,2 на 100 тысяч населения [65].

В республике Карелия мы не обнаружили ВКЭ в клещах *I. ricinus*. По-видимому, вирусофорность клещей *I. ricinus* составляет менее 1%. В Финляндии вирусофорность клещей *I. ricinus* также составляет менее 1% [137, 145, 146]. Для клещей *I. persulcatus* вирусофорность составила 0,3 – 1,7%. Эти значения коррелируются с данными по Ленинградской области, где вирусофорность клещей *Ixodes* sp. в лесопарковой зоне г. Санкт-Петербурга составила 0,3% [52]. Такие же значения этого показателя были отмечены в Латвии [156] и в Швеции [148]. В Финляндии вирусофорность клещей *I. persulcatus* составляет 3% [170], в Эстонии – 4,2% [156]. В соседних с Республикой Карелия северо-восточных районах РФ – Архангельской области [66] и Коми [45, 234] регистрируются более высокие показатели вирусофорности клещей *I. persulcatus*.

Все выделенные нами штаммы ВКЭ относились к балтийской группе сибирского подтипа. Мы не обнаружили штаммы дальневосточного и европейского подтипов ВКЭ, которые встречаются в близких с Карелией районах – в республике Коми [45] и Финляндии [147], соответственно. Ранее при филогенетическом анализе было показано, что два штамма ВКЭ, выделенные из *I. persulcatus* в Карелии, относятся к разным ветвям в рамках одной монофилетической группы в балтийской группе сибирского подтипа [145], что, по мнению авторов, может указывать на независимые интродукции ВКЭ в Карелию. Наши исследования показали, что одной из особенностей балтийской группы ВКЭ является отсутствие прямой связи между генетическим и географическим расстоянием у разных изолятов. Это, в свою очередь, может быть связано с участием

перелетных птиц в распространении ВКЭ на большие расстояния [116]. В данной работе штаммы ВКЭ из республики Карелия образовывали три монофилетические группы в рамках балтийской группы сибирского подтипа ВКЭ. В одну группу вошли штаммы только из республики Карелия (д. Гомсельга [116] и пригород Петрозаводска [145]). Эта группа показала высокую генетическую стабильность и фактически представляет локальный очаг (расстояние между точек сбора клещей менее 30 км). Штаммы, изолированные с интервалом в 12 лет (2006г., 2014г. и 2018г.) на участке генома, кодирующего фрагмент белка E (1225 нт), показали уровень дивергенции менее 0,7%. С другой стороны, в том же месте были изолированы штаммы, которые входили в другие монофилетические группы, которые помимо карельских штаммов включали штаммы, изолированные из клещей с более отдаленных территорий (расстояние между точек сбора клещей более 700 км). В одну группу входили штаммы из Эстонии и Вологодской области, а в другую - штаммы из Эстонии и штамм Volkhov-2-43 из Ленинградской области, который был выделен в 1943 году и, по-видимому, был занесен на эту территорию во время Второй мировой войны. Очевидно, что требуется больше информации о вирусах из соседних регионов, но этот срез данных показывает, что помимо стабильного локального очага КЭ, на территорию республики Карелия происходит занос ВКЭ из Эстонии и Вологодской области.

На Куршской Косе и прилегающих территориях Калининградской области заболеваемость КЭ составляла 1 – 4 случая на 100 тыс. населения [70]. В нашей работе были исследованы только клещи *I. ricinus*, собранные нами на Куршской Косе. Мы не детектировали ВКЭ в клещах. Так как Куршская коса является местом перелета птиц, и отсутствие постоянного очага КЭ связано, по-видимому, с низкой зараженностью клещей *I. ricinus*. Тем не менее, этот очаг требует пристального внимания.

В Республике Тыва РНК ВКЭ была детектирована в клещах *I. persulcatus*, *D. silvarum* и *D. nuttalli*, при этом достоверных различий между вирусофорностью клещей рода *Dermacentor* и *I. persulcatus* не наблюдалось, что отличается от общемировых данных. Так, сообщалось, что в республике Алтай зараженность клещей *D. silvarum* и *D. nuttalli* достоверно выше, чем зараженность *I. persulcatus* [217]. В Жигулевском заповеднике, располагающемся в центральной части России, где встречаются клещи трех видов: *I. persulcatus*, *D. reticulatus* и *D. marginatus*, численность и инфицированность клещей рода *Dermacentor* ВКЭ была выше, чем у *I. persulcatus*

(4,3% против 1,4%, соответственно) [46]. В Польше зараженность ВКЭ *D. reticulatus* составляла 10,8% [244].

В нашей работе РНК ВКЭ была детектирована в клещах рода *Dermacentor*, только в республике Тыва, часть из которых были выловлены на территориях, где данные клещи доминируют (точки 9 и 32) (Рисунок 22). В республике регистрируются случаи заболевания КЭ в степных районах, однако, отсутствуют подтверждения, что пациент заболел после присасывания именно клеща рода *Dermacentor* именно в степных районах. Неоднократно поднимался вопрос о возможной роли клещей рода *Dermacentor* в поддержании природных очагов клещевого энцефалита [3, 48, 50, 93, 96, 152, 154, 175, 199, 244]. Первые предположения о возможной роли клещей этого рода в поддержании стабильных очагов ВКЭ были сделаны в 60-х гг. прошлого века. Основанием послужили случаи заболевания КЭ в лесостепных районах Сибири в 1959-1960 гг., где преобладали клещи *D. reticulatus*, а клещи рода *Ixodes* отсутствовали [50]. Наши наблюдения показывают, что клещи *D. nuttalli* довольно часто нападают на людей, и первые обращения в связи с заболеванием после укуса клещом этого вида регистрируются с начала апреля, когда *I. persulcatus* практически отсутствует. Описано небольшое количество случаев заболевания КЭ после укуса клещами рода *Dermacentor* [8].

Устойчивая циркуляция ВКЭ в природном очаге зависит от возможности вируса реплицироваться и продолжительное время сохраняться в организме переносчика, а также от эффективности вертикальной и горизонтальной передачи среди переносчиков. Экспериментально доказана возможность сохранения ВКЭ в клещах *D. marginatus* и *D. reticulatus* более 80 суток [96, 199]. Для *D. reticulatus* установлены трансовариальная и трансфазовая передачи ВКЭ [18]. Нами было установлено, что клещи *D. reticulatus* и *D. marginatus* способны в экспериментальных условиях воспринимать, поддерживать репликацию, долгосрочно сохранять и эффективно передавать ВКЭ трансфазово [93, 96]. Также доказана возможность передачи ВКЭ клещами *D. marginatus* при совместном питании зараженных и незараженных особей на животном [2, 152]. Все вышесказанное говорит о возможности клещей рода *Dermacentor* успешно поддерживать циркуляцию ВКЭ в экспериментальных условиях.

Как известно, неполовозрелые формы клещей рода *Dermacentor* не способны перезимовывать, в отличие от преимагинальных фаз клещей рода *Ixodes* [4]. Считается, что перезимовка преимагинальных фаз клещей является необходимым условием для успешного поддержания циркуляции вируса. С одной стороны, вероятно, что при

высокой численности клещей рода *Dermacentor* для поддержания очага достаточно зимовки только половозрелых форм. С другой стороны, в 1962 г. была высказана гипотеза о способности неполовозрелых форм клещей *D. nuttalli* перезимовывать. Основанием послужило появление на зверьках единичных экземпляров нимф раньше личинок на месяц [16]. Также сотрудниками Тувинской противочумной станции в апреле 2014 и 2015 годах были сняты с сусликов нимфы *D. nuttalli*. Это может служить подтверждением гипотезы о способности неполовозрелым формам клещей *D. nuttalli* перезимовывать в условиях микроклимата нор сусликов, либо о начале питания имаго клещей в январе-феврале, т.к. время от начала питания имаго до развития нимфы составляет 67 – 130 дней [4]. Подтверждение или опровержение этой гипотезы требует дальнейших экспериментальных исследований.

Таким образом, представленные нами данные о выявлении вируса в районах с абсолютным преобладанием клещей рода *Dermacentor* и о возможной способности неполовозрелых форм перезимовывать при благоприятных условиях свидетельствуют в пользу возможности клещей этого рода самостоятельно поддерживать очаг КЭ.

Отдельного внимания требует вопрос о риске заражения и заболевания людей в очагах КЭ, где доминируют или обитают совместно клещи рода *Ixodes* и *Dermacentor*. Если риск заражения ВКЭ в основном определяется такими показателями как численность переносчиков, зараженность популяции переносчика вирусом и агрессивностью клеща по отношению к человеку, то риск заболевания зависит от особенности человеческой популяции (генетической предрасположенностью, иммунной прослойкой и т.д.) [246], дозы вируса, полученной при присасывании клеща, и от свойств самой вирусной популяции (нейроинвазивность). Вид клеща, в свою очередь, может влиять как на риск заражения, так и на риск заболевания людей в очаге КЭ. Так, адаптация ВКЭ к клещам *I. ricinus* и *D. reticulatus* путем последовательных парентеральных пассажей приводит к появлению вариантов со сниженной нейроинвазивностью для лабораторных мышей [6, 96]. Появление подобных вариантов в природной вирусной популяции может привести к тому, что риск заражения в природном очаге может оставаться высоким, но при этом риск заболевания будет низким. Продемонстрированная нами трудность изоляции вируса из клещей рода *Dermacentor*, а также малая представленность в GenBank геномов ВКЭ из этого рода клещей косвенно подтверждают это. Для окончательного ответа на вопрос о существовании очагов КЭ, поддерживаемых исключительно клещами рода *Dermacentor*,

и об эпизоотическом и эпидемическом потенциалах подобных очагов требуется проведение дальнейших исследований.

В близлежащей республике Алтай было показано, что с увеличением подъема снижается вирусофорность клещей [217]. По нашим данным вирусофорность клещей не зависит от высоты подъема над уровнем моря. Так, в республике Тыва, наивысшими точками, где нами был выявлен ВКЭ, были 1538,7 м н.у.м. для *I. persulcatus*, 1520 м н.у.м. для *D. nuttalli* и 1031 м н.у.м. – *D. silvarum*. В Центральной Европе ВКЭ находили до 1140 м н.у.м., а также регистрировали случаи заболевания КЭ на высоте 1500 м н.у.м. [112, 139].

В республике Татарстан, Ульяновской и Челябинской областях отмечается циркуляция ВКЭ [10, 12, 39, 40, 166, 192]. Также в Челябинской области отмечены случаи заболевания лихорадкой Западного Нила [59]. В нашей работе число исследованных клещей из эндемичных по КЭ районов республики Татарстан и Ульяновской области было меньше 100 особей. Так как мы не детектировали ВКЭ в клещах, то вирусофорность клещей составляла менее 1%. Сбор клещей в Челябинской области проводили в степных и лесостепных районах. В этих районах отмечается спорадическая заболеваемость и вирусофорность клещей менее 1%.

Двадцать одна последовательность вируса Янгтоу, полученные из клещей, собранных в Синьцзян-Уйгурском автономном районе Китая, были впервые депонированы в GenBank в июле 2018 года (номера доступа MN688529-MN688539 трех штаммов, полученных от клещей *D. nuttalli*, и MN688679-MN688696 18 штаммов, полученных от неустановленных видов клещей). Филогенетический анализ, проведенный по фрагментам сегментов 1 и 3, показал, что вирус Янгтоу тесно связан с вирусом Алонгшан, и оба вируса кластеризуются отдельно от других вирусов группы Джингмен [239]. Нами в Республике Тыва вирус Янгтоу был найден в клещах *D. nuttalli* [158], вирусофорность клещей составила 0,49%. На близлежащей территории в Республике Алтай также был обнаружен вирус Янгтоу в клещах *D. marginatus*, вирусофорность клещей составила 8% [158]. Поскольку клещи *D. marginatus* встречаются не только в России и Китае, но также в Европе и Северной Африке [211], можно ожидать распространения этого вируса и в других странах. Нами был выделен штамм Erzin14-T20074 вируса Янгтоу из напивавшихся клещей *D. nuttalli*, собранных с крупного рогатого скота в Республике Тыва [158]. Мы не можем исключить возможность того, что вирус Янгтоу был получен во время питания клеща на

зараженном животном, так как ранее была показана вирусемия у млекопитающих, инфицированных другими представителями группы Джингмен [123, 238, 239].

Впервые вирус Алонгшан был обнаружен в Китае у пациента с диагнозом лихорадка неясной этиологии [238]. В дальнейшем этот вирус был обнаружен в клещах *I. persulcatus* [158, 159, 238] и *I. ricinus* [169, 230], а также в комарах *Culex tritaeniorhynchus* и *Anopheles yatsushiroensis* [238], и в материалах от овец и крупного рогатого скота [239]. Мы обнаружили вирус Алонгшан в разных регионах России в 39 образцах голодных клещей *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *D. reticulatus* и *D. nuttalli*. Наибольшее количество ампликонов в одном месте сбора было детектировано в Калининградской области (3 ампликона) и в Челябинской области (9 ампликонов). Малое количество ампликонов в одном сборе было детектировано в Ульяновской области (1 ампликон), республике Карелия (2 ампликона), республике Татарстан (1 ампликон) и республике Тыва (1 ампликон). Наименьшая вирусофорность клещей была в республике Тыва, республике Карелия и республике Татарстан, и составляла 0,6%, 0,8% и 1,4% соответственно, что сопоставимо с вирусофорностью клещей ВКЭ. В остальных регионах вирусофорность клещей составляла от 4,3% (Челябинская область) до 7,8% (точка 2 в Калининградской области), что выше, чем вирусофорность клещей ВКЭ.

Обнаружение вируса Алонгшан на большой территории от Калининградской области в Европе до республики Тыва в Азии указывает на то, что этот вирус широко распространен в России. Это особенно важно с учетом того факта, что есть информация о том, что вирус может вызывать заболевание у человека (с такими симптомами, как головная боль, жар, усталость и депрессия) [238].

3.3 Общая характеристика выявленных флавиподобных вирусов

3.3.1 Вирус Алонгшан

3.3.1.1 Выделение вируса на культурах клеток

Семь случайно выбранных проб (Miass502, Miass506, Miass519, Miass527, Miass15-T22516, Miass15-T22517, Galozero-14-T20426), положительных на вирус Алонгшан, были использованы для заражения культуры клеток клещей *I. ricinus* (IRE/CTVM19). Ни один из семи штаммов не оказывал ЦПД на клетки. Также, мы проверили возможность вируса Алонгшан (штамм Miass527) размножаться в культуре клеток клещей *Hyalomma anatolicum anatolicum* (HAE/CTVM8). Штамм Miass527

успешно размножался в культуре клеток HAE/CTVM8 более 13 месяцев без ЦПД [157, 158].

3.3.1.2 Определение полной нуклеотидной последовательности генома и изучение морфологии вирионов вируса Алонгшан

Для ВПС и электронной микроскопии была использована КЖ неинфицированных клеток IRE/CTVM19, а также КЖ клеток IRE/CTVM19, зараженных штаммом Miass527, собранная на 17, 19, 20 и 32 месяцы персистентной инфекции. Ранее было показано, что культура клеток IRE/CTVM19 содержит последовательности РНК, сходные с рабдовирусами [90]. При ВПС нами было выявлено, что культура клеток IRE/CTVM19 заражена эндогенным рабдовиром, который был назван IRE/CTVM19-ассоциированным рабдовиром, штамм BSLab (номер GenBank – MT181988). Для его выявления были подобраны специфические праймеры (Таблица 1).

Чтобы предотвратить путаницу между вирусом Алонгшан и этим рабдовиром при нашем микроскопическом исследовании, осадок, полученный после УЦФ КЖ клеток IRE/CTVM19, зараженных штаммом Miass527, был разделен в градиенте плотности сахарозы и для электронной микроскопии была отобрана фракция №7 с наибольшим количеством РНК вируса Алонгшан и очень низкими уровнями РНК рабдовируса (Рисунок 24).

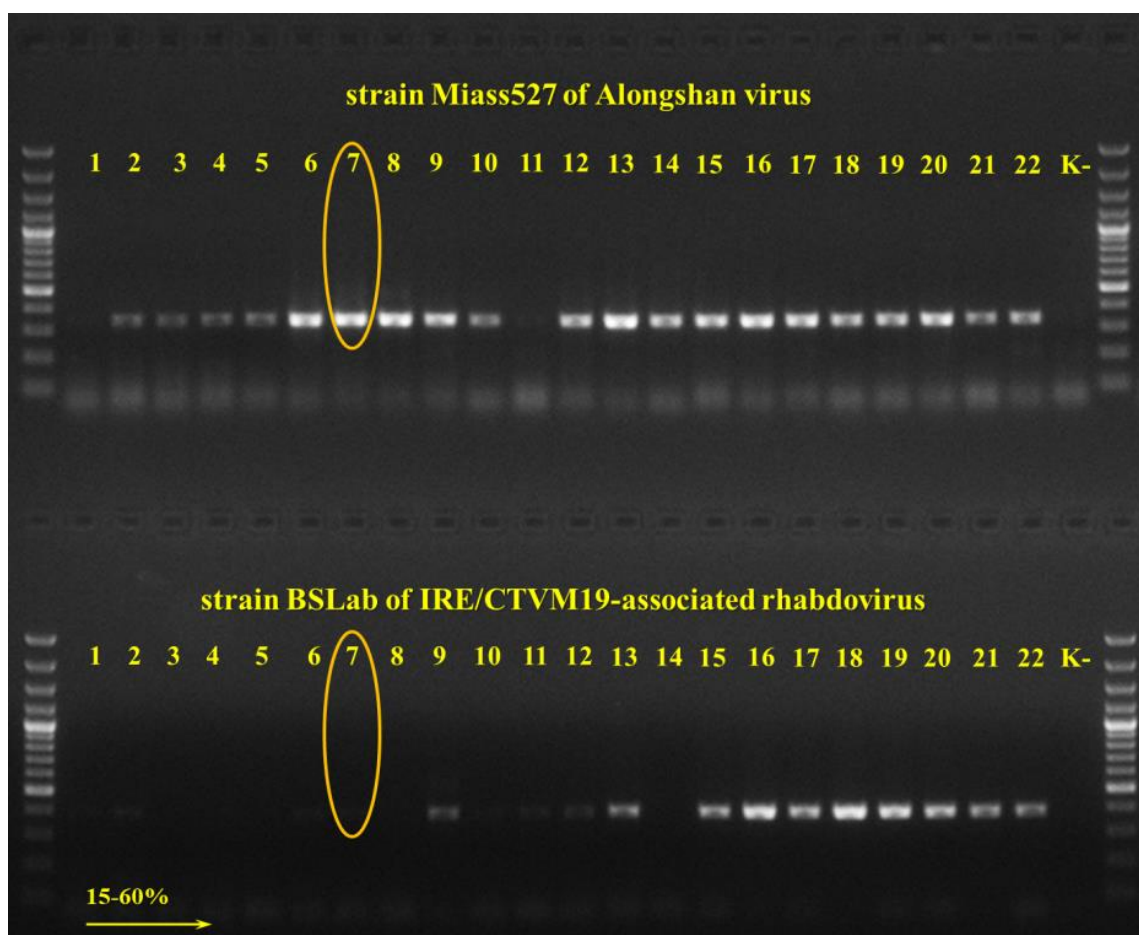


Рисунок 24 – Исследование фракций градиента плотности сахарозы с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров на рабдовирус и на сегмент 2 вируса Алонгшан [159].

Микроскопия показала, что большинство вирионов штамма Miass527 представляли собой сферические частицы диаметром $40,5 \pm 3,7$ нм (Рисунок 25, А, Б; Рисунок 26, А). У них были либо электроннопрозрачные, либо электронно-плотные ядра. Вирусные частицы с электронно-плотным ядром могли потерять гРНК (Рисунок 25, Б). В той же фракции градиента мы обнаружили маленькие сферические частицы диаметром $13,1 \pm 2,1$ нм, которые имели электроннопрозрачные или электронно-плотные ядра (Рисунок 25, В, Г; Рисунок 26, Б). Эти маленькие частицы могут быть вирионами вируса Алонгшан с неполным набором сегментов, белковыми структурами или каким-либо другим неидентифицированным компонентом клеток IRE/CTVM19. Осадок, полученный после УЦФ КЖ неинфицированной культуры IRE/CTVM19, разделяли УЦФ в градиенте плотности сахарозы. Для просвечивающей электронной микроскопии мы использовали ту же фракцию градиента, что и для инфицированных вирусом Алонгшан клеток IRE/CTVM19. В этой фракции мы обнаружили мелкие сферические частицы диаметром $15,7 \pm 1,8$ нм, которые были несколько больше, чем во фракции градиента с вирусом Алонгшан и имели электронно-плотные ядра (Рисунок 25,

Д; Рисунок 26, В). Во фракции градиента № 7 (Рисунок 24) ни из инфицированных вирусом Алонгшан, ни из неинфицированных клеток IRE/CTVM19 не наблюдали частиц, похожих на рабдовирусы [159].

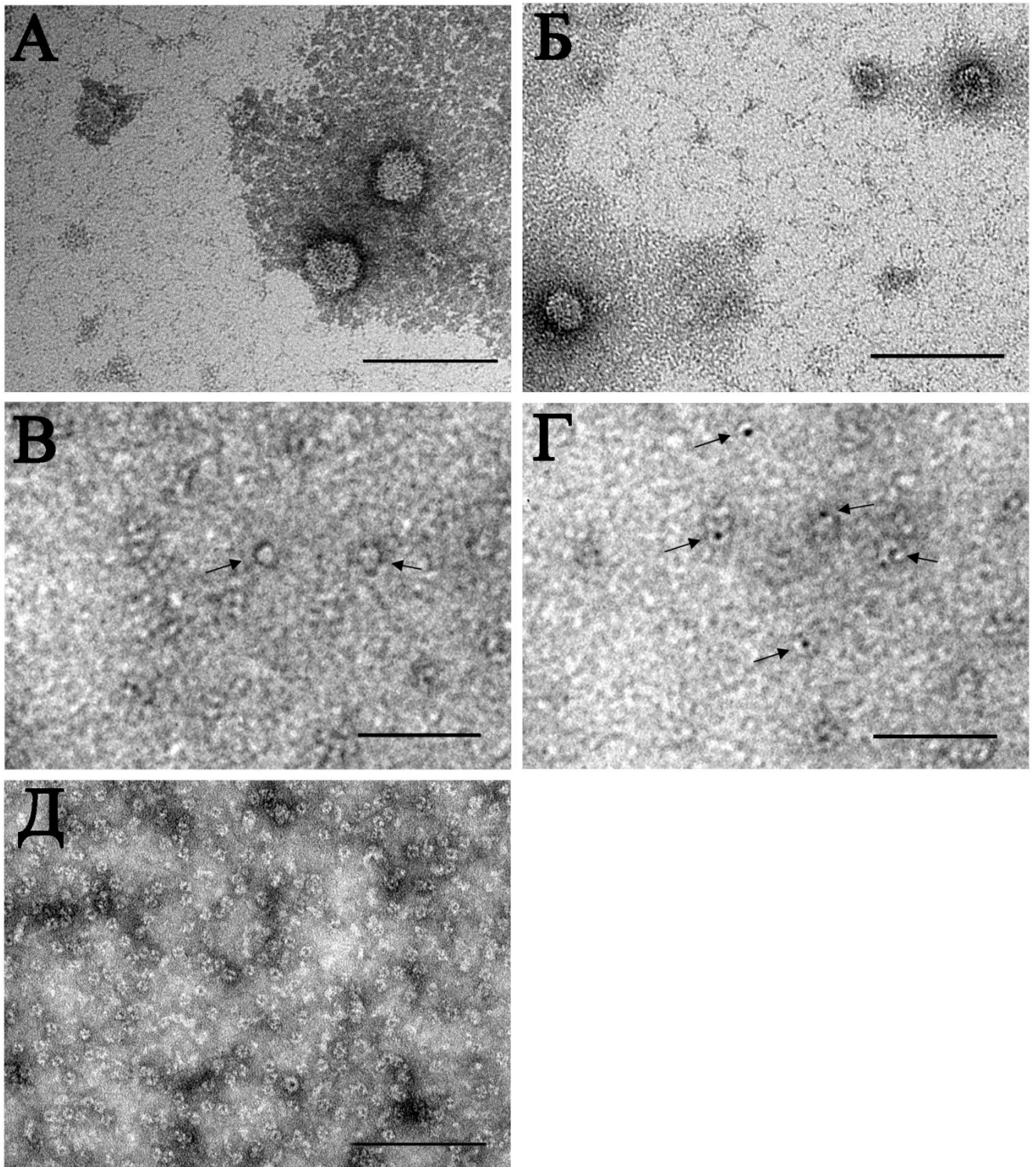


Рисунок 25 – Просвечивающая электронная микроскопия [159]. Электронные микрофотографии очищенных вирусных частиц штамма Miass527 вируса Алонгшан, размноженного в клетках IRE/CTVM19 (А, Б). Видны мелкие частицы с электронно-полупрозрачным (В) или электронно-плотным (Г) ядром. Небольшие частицы с электронно-плотным ядром и другим размером также наблюдались в соответствующей фракции ультрацентрифугированного

супернатанта из неинфицированных клеток IRE/CTVM19 (Д). Образцы окрашивали 2% уранилацетатом. Масштабные полосы, 100 нм.

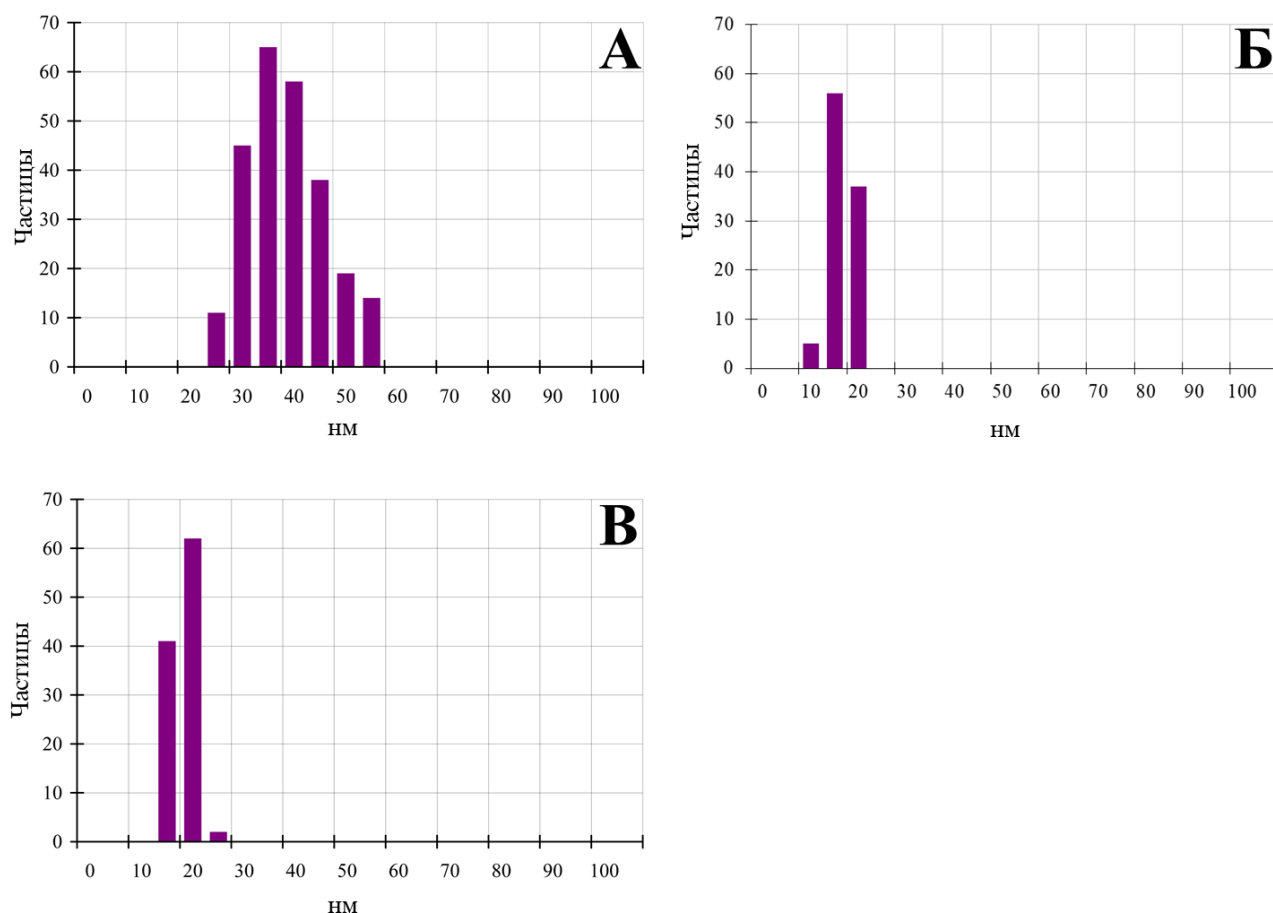
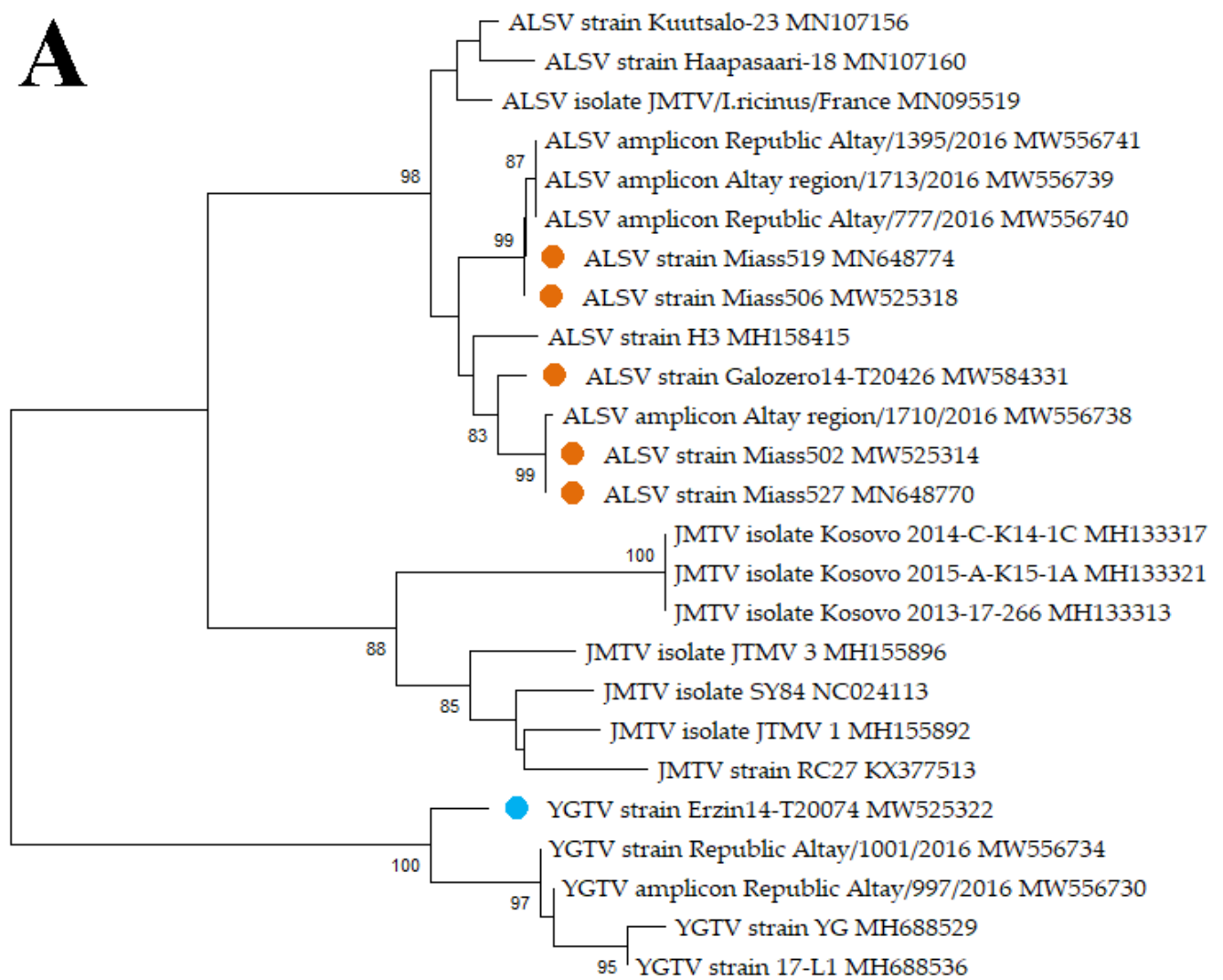


Рисунок 26 – А. Диапазон размеров вирионов, обнаруженных при просвечивающей электронной микроскопии штамма Miass527 вируса Алонгшан. Большинство вирионов представляют собой частицы сферической формы диаметром $40,5 \pm 3,7$ нм. Б. Размер мелких сферических частиц, обнаруженных при просвечивающей электронной микроскопии штамма Miass527 вируса Алонгшан. Частицы имели диаметр $13,1 \pm 2,1$ нм. В. Размер мелких сферических частиц, обнаруженных при просвечивающей электронной микроскопии ультрацентрифугированных супернатантов из неинфицированных клеток IRE/CTVM19. Частицы имели диаметр $15,7 \pm 1,76$ нм.

3.3.1.3 Филогенетическое взаимоотношение

Для филогенетического анализа были использованы все гомологичные РНК последовательности вируса Алонгшан из GenBank, а также ампликоны/штаммы, описанные в данной работе. Филогенетический анализ проводился по 188 нт фрагмента сегмента 1 (Рисунок 27, А) и 233 нт фрагмента сегмента 2 (Рисунок 27, Б). Все полученные нами штаммы относились к вирусу Алонгшан по анализу обоих фрагментов. Ветвление филогенетического дерева практически одинаковое при анализе фрагментов генома сегментов 1 и 2.

A

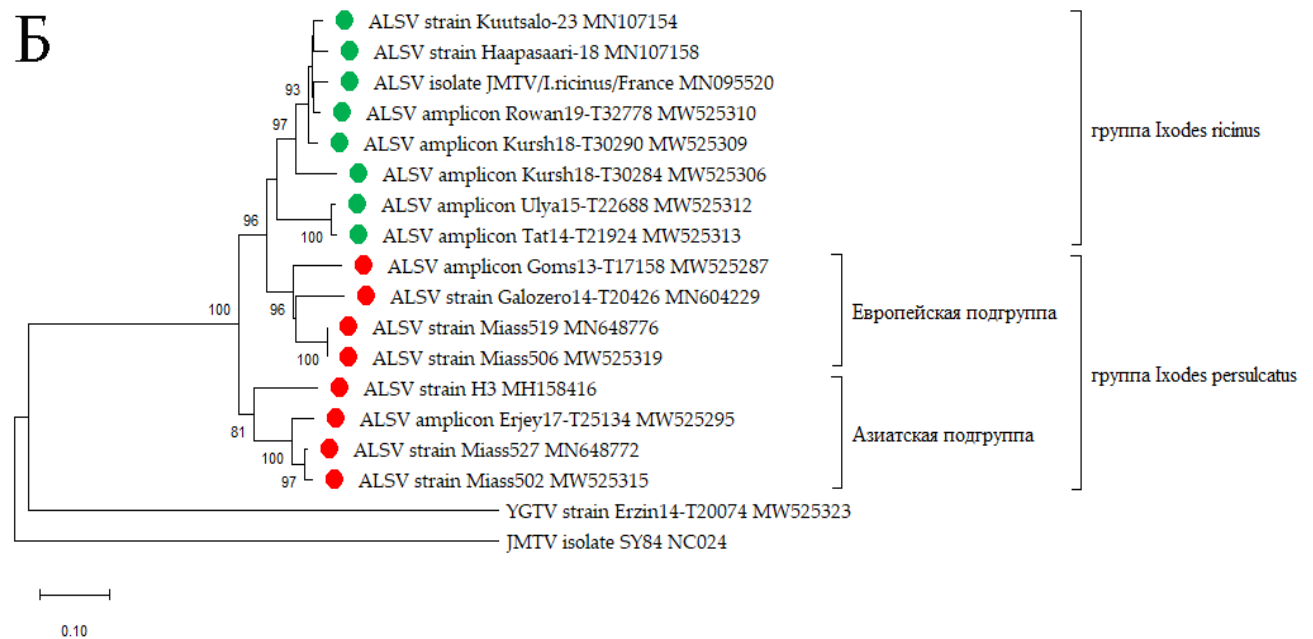
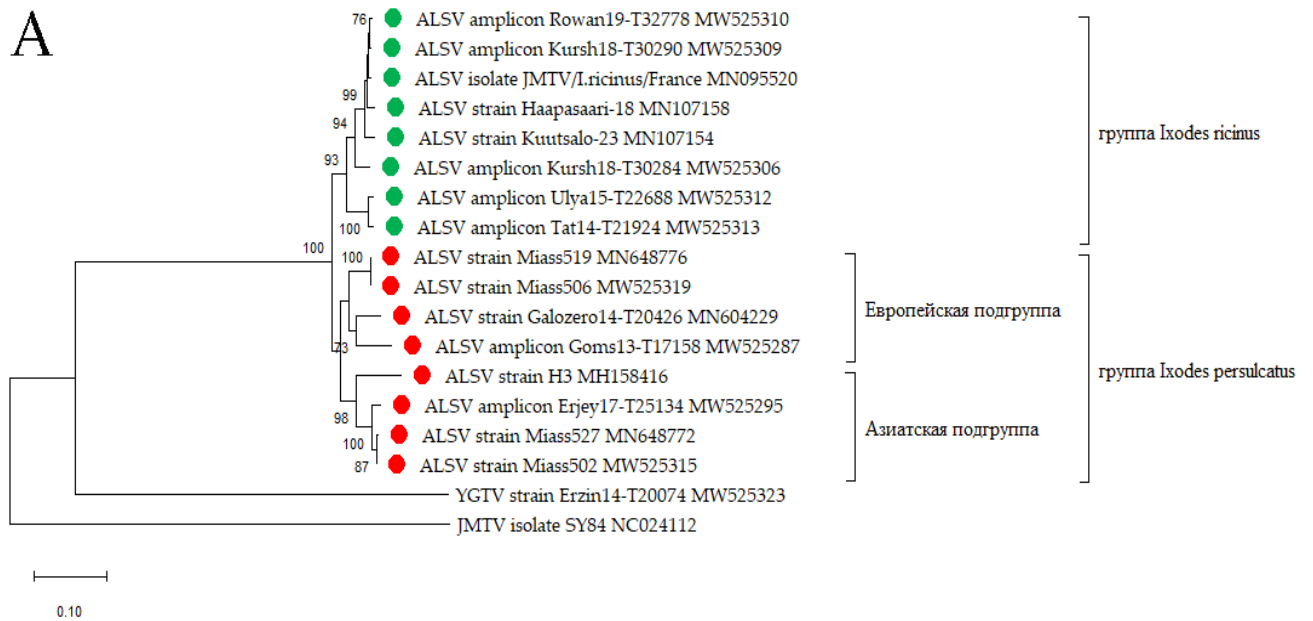
0.10

Б

Рисунок 27 – Филогенетические деревья вирусов Алонгшан и Янггоу [158]. Филогенетические деревья были построены с использованием метода ближайшего соседа в MEGA X. Оранжевые кружки – ампликоны/штаммы вируса Алонгшан, описанные в данном исследовании. Синие кружки – штамм вируса Янггоу, описанный в данном исследовании. **А.** Филогенетическое дерево фрагмента 188 нт сегмента 1. **Б.** Филогенетическое дерево фрагмента 233 нт сегмента 2.

Сегмент 2 кодирует белки VP1a, VP1b и nuORF [159]. Так как, по-видимому, белки VP1a и VP1b являются поверхностными структурными белками [118], мы

предположили, что эти белки могут определять круг хозяев. Для 4 штаммов Miass502, Miass506, Miass519 и Miass527 была получена нуклеотидная последовательность полного генома вируса с помощью ВПС из очищенного супернатанта клеток IRE/CTVM19. Для 7 ампликонов была получена нуклеотидная последовательность части генома сегмента 2 с помощью секвенирования по Сэнгеру. Филогенетический анализ проводился по полной аминокислотной последовательности белков VP1a, VP1b и nuORF, сегмента 2 (Рисунок 28 А, В, С).



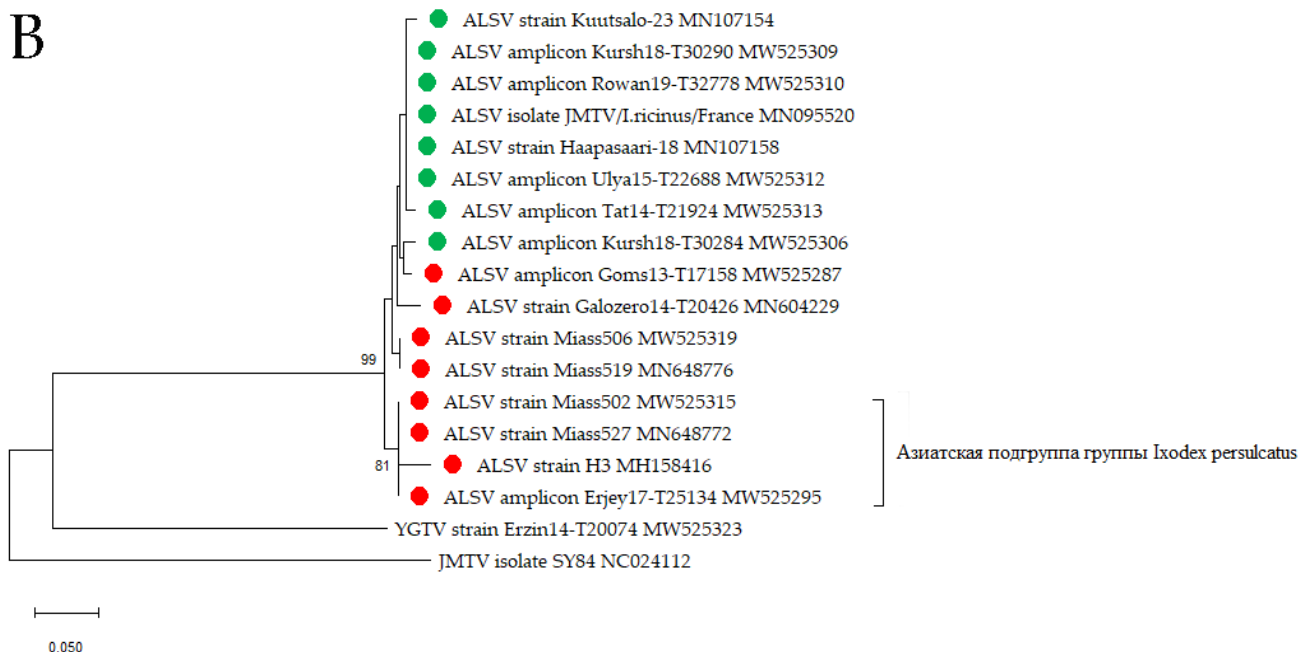


Рисунок 28 – Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков сегмента 2 вируса Алонгшан (ALSV) был выполнен с использованием метода объединения соседей в MEGA X [158]. Красный кружок – группа «*Ixodes persulcatus*», зеленый кружок – группа «*Ixodes ricinus*». **А.** Полная аминокислотная последовательность белка VP1a. **Б.** Полная аминокислотная последовательность белка VP1b. **В.** Полная аминокислотная последовательность белка nuORF. YGTV = вирус Янгтоу; JMTV = вирус Джингмен.

При филогенетическом анализе последовательности белка VP1a штаммы разделились на группы, соответствующие ареалу клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus*, в свою очередь, группа «*I. persulcatus*» разделилась на азиатскую и европейскую подгруппы (Рисунок 28, А). Штаммы Galozero14-T20426 и Coms13-T17158, изолированные в республике Карелия, и штаммы Miass519 и Miass506 из Челябинской области образовывали европейскую подгруппу, а штаммы Erjei17-T25134 (республика Тыва), H3 (Китай) и два штамма Miass527 и Miass502 из Челябинской области, образовывали азиатскую подгруппу группы «*I. persulcatus*».

При филогенетическом анализе последовательности белка VP1b сначала происходит разделение вирусов по географическому признаку на азиатскую подгруппу, все представители которой изолировались на территории ареала клещей *I. persulcatus* и европейскую группу, которая в свою очередь разделилась согласно ареалу клещей на группы «*I. persulcatus*» и «*I. ricinus*» (Рисунок 28, Б).

Филогенетический анализ по полной аминокислотной последовательности белка nuORF показал наличие только азиатской подгруппы группы «*I. persulcatus*», поддержки

других группы не было (Рисунок 28, В). Это может быть связано с тем, что аминокислотная последовательность белка nuORF короткая и высоко консервативна.

Были изучены различия в аминокислотных последовательностях белков nuORF, VP1a и VP1b между группами «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». В белке VP1a было найдено 7 замен, которые были специфичны для групп «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». Эти замены были в позиции 72, 115, 135, 138, 153, 216 и 472 (Таблица 27). В белке VP1b была найдена только одна замена в позиции 276 (Таблица 27). В белке nuORF специфических замен, характерных для групп «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*», не обнаружено.

Также были обнаружены аминокислотные различия в последовательностях белков nuORF, VP1a и VP1b между европейской и азиатской подгруппами группы «*I. persulcatus*». В белке nuORF было найдено 3 аминокислотных отличий в позициях 4, 15 и 32, в белке VP1a – 6 специфических замен в позициях 8, 210, 321, 460, 476 и 479, в белке VP1b – 4 специфические замены в 118, 172, 187 и 195 позициях (Таблица 27) [158].

Таблица 27 – Специфические аминокислотные замены в белках nuORF, VP1a и VP1b вируса Алонгшан [158]

Позиция аминокислоты в белке	Группа « <i>I. ricinus</i> »	Группа « <i>I. persulcatus</i> »	
		Европейская подгруппа	Азиатская подгруппа
белок VP1a			
8	Ala	Ala	Thr
72	Val	Ala	Ala
115	Ala	Val	Val
135	Val	Lys	Lys
138	Pro	Ser	Ser
153	Lys	Arg	Arg
210	Gly	Gly	Ser
216	Thr	Ala	Ala
321	Val	Val	Thr
460	Thr	Met	Thr
472	Arg	His	His
476	Arg	Arg	Gln
479	Arg/His	Arg	His

белок VP1b			
118	Met	Met	Leu
172	Ile	Ile	Val
187	Lys	Lys	Arg
195	Ser	Ser	Gly
276	Val	Ile	Ile
белок nuORF			
4	Lys	Lys	Gln
15	Asp	Asp	Asn
132	Thr	Ala	Thr

Красный цвет – специфические аминокислотные замены, различающие группы «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». Зеленый цвет – специфические аминокислотные замены, различающие Европейскую и Азиатскую подгруппы группы «*I. persulcatus*».

3.3.2 Вирус Янггоу

Вирус Янггоу был детектирован только в пуле клещей *D. nuttalli*, собранных со скота в республике Тыва (Рисунок 14; Точка 32). Вирусофорность клещей для этой местности составила 0,5% (Таблица 9).

Штамм Erzin14-T20074 вируса Янггоу длительно персистировал в культурах клеток IRE/CTVM19 и HAE/CTVM8 в течение 11 и 7 месяцев, соответственно, и не оказывал цитопатического эффекта.

С помощью ВПС была получена нуклеотидная последовательность полного генома. Для филогенетического анализа были использованы последовательности трех штаммов вируса Янггоу из GenBank и штамм Erzin14-T20074. Филогенетический анализ был проведен по 188 нт фрагмента сегмента 1 и 233 нт фрагмента сегмента 2. Штамм Erzin14-T20074 кластеризовался с другими штаммами вируса Янггоу и образовывал отдельную монофилетическую группу (Рисунок 27) [158].

3.3.3 Обсуждение

Штаммы вируса Алонгшан из Китая были выделены из образцов крови млекопитающих с использованием клеток Vero [238, 239], в то время как штаммы из Финляндии не размножались в культуре клеток Vero и двух линиях клеток человека (SK-N-SH (нейробластома человека) и CRL-2088 (фибробласты человека)) [169]. Штамм вируса Джингмен из Китая, выделенный из клещей *A. javanense*, успешно реплицировался в клеточной линии BME/CTVM23, полученной из эмбрионов клещей

R. microplus, но не размножался в культурах клеток Vero, DH82 (собачьи клетки, полученные из моноцитов-макрофагов) и C6/36 (*Aedes albopictus*) [151]. Сообщений о способности штаммов вируса Янгтоу реплицироваться в культурах клеток или в лабораторных животных не было.

В нашей работе семь штаммов вируса Алонгшан и штамм вируса Янгтоу успешно размножались в культуре клеток IRE/CTVM19, формируя персистентную инфекцию. Мы впервые показали, что штамм Miass527 вируса Алонгшан может сохраняться в клетках клещей не менее трех лет. Кроме того, мы впервые в мире показали способность штамма Miass527 вируса Алонгшан и штамма Erzin14-T20074 вируса Янгтоу вызывать длительную персистентную инфекцию в культуре клеток HAE/CTVM8 [158, 159]. Воспроизведение вирусов Янгтоу и Алонгшан в клеточных линиях разных видов клещей может указывать на то, что различные виды клещей могут быть векторами или, что эти вирусы могут быстро адаптироваться к разным видам клещей. Например, ВКЭ размножается в клещах рода *Dermacentor*, чья компетентность в качестве естественных векторов ВКЭ обсуждается [96, 175, 199], и даже в клещах *H. marginatum* [210], который, как известно, не является вектором для этого вируса. С другой стороны, линии клещевых клеток могут поддерживать репликацию широкого спектра арбовирусов, переносимых клещами и насекомыми, которые, как известно, не передаются клещами или комарами, из которых получены эти линии клеток [91]. Также персистентная инфекция в культуре клеток клещей и клещах может влиять на свойства вируса, как было ранее показано для ВКЭ [96].

До начала нашей работы были противоречивые данные о размерах вирионов представителей группы Джингмен, которые находились в диапазоне от 30-35 нм до 70-100 нм [171, 205, 238]. Вирионы штамма НЗ вируса Алонгшан, полученные на культуре клеток Vero, представляют собой сферические (или почти сферические) частицы с оболочкой диаметром приблизительно 80-100 нм [238]. Размер вирионов нашего штамма Miass527 составил $40,5 \pm 3,7$ нм. При проведении электронной микроскопии некоторые вирусные частицы имели электронно-плотные ядра и гипотетически могли быть дефектными вирионами без гРНК [162]. Кроме того, были обнаружены более мелкие частицы диаметром $13,1 \pm 2,1$ нм с электроннопрозрачным или электронно-плотным ядром. Предположительно, они могли представлять собой: а) агрегаты гликопротеинов, аналогичные «классическому» неструктурному белку (NS1) флавивируса, который секретируется инфицированными клетками [84, 195], б) белковые

структуры, появляющиеся после длительной персистенции вируса, в) вирионы с неполным геномом, т.е. содержащие не полный набор сегментов, или г) вирионы неизвестного вируса или другие неизвестные структуры, присутствующие в клетках IRE/CTVM19. В эквивалентной градиентной фракции неинфицированных клеток мы обнаружили только частицы диаметром $15,7 \pm 1,8$ нм, то есть немного больше, чем мелкие частицы, которые мы видели в той же фракции клеток инфицированных штаммом Miass527. В любом случае частицы были меньше мельчайших вирионов парвовируса диаметром 18-26 нм [190].

Согласно филогенетическому анализу, проведенному с использованием фрагментов генома сегментов 1 и 2, так и полных аминокислотных последовательностей белка VP1a (сегмент 2), штаммы вируса Алонгшан можно разделить на две клады: группа «*I. persulcatus*» и группа «*I. ricinus*». Филогенетический анализ VP1b, кодируемого сегментов 2, показал присутствие азиатских и европейских клад, последняя из которых была разделена на «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». Независимо от того, какой фрагмент генома или белок использовался в филогенетическом анализе, штаммы, выделенные из областей абсолютного доминирования *I. persulcatus* (без *I. ricinus*) или *I. ricinus* (без присутствия *I. persulcatus*), образовывали отдельные группы. Ареалы клеща *I. persulcatus* включают республики Тыва [157], Челябинскую область [29] и Китай [248], тогда как клещ *I. ricinus* населяет Калининградскую область [85] и Европу, в том числе Франция [188]. Мы можем наблюдать ту же картину с ВКЭ, когда распространение европейского подтипа связано с клещами *I. ricinus*, а сибирский и дальневосточный подтипы с клещами *I. persulcatus* [212].

Разделение изолятов вируса Алонгшан на группы в зоне симпатрии клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* четко не определено. Зона симпатрии этих видов клещей проходит по территориям республик Татарстан и Карелия [101], Ульяновской области и Финляндии [170]. В Финляндии вирус Алонгшан был обнаружен в месте, где обитают только клещи *I. ricinus* [169], в республике Карелия – только клещи *I. persulcatus* [101, 158, 159]. Два финских штамма [169], принадлежали группе «*I. ricinus*». Несколько иная ситуация наблюдалась в республике Карелия, где в клещах *I. persulcatus* было обнаружено десять ампликонов вируса Алонгшан, из которых шесть ампликонов и один изолированный штамм принадлежат к группе «*I. persulcatus*», а три ампликона, Goms13-T17182/2, Goms13-T17190/2 и Goms14-T20532 – к группе «*I. ricinus*». Это может быть связано с тем, что в филогенетическом анализе использовались короткие

последовательности. Однако, если эти три ампликона действительно принадлежат группе «*I. ricinus*», то это могло произойти в результате заноса вируса животными или птицами на близлежащую территорию, на которой клещи *I. ricinus* никогда не встречались. Также нельзя исключить возможность заражения клещей *I. persulcatus* штаммами вируса Алонгшан, принадлежащими к группе «*I. ricinus*», и наоборот, как показано на примере ВКЭ в зоне симпатрии [144, 147]. В Ульяновской области мы обнаружили две положительные пробы в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus*. Ампликон Ulya15-T22688 из *I. ricinus* принадлежал кладе «*I. ricinus*», а ампликон Ulya14-T20695 из *D. reticulatus* принадлежал кладе «*I. persulcatus*». Поскольку на территории Ульяновской области обитают не только клещи рода *Ixodes*, но и других родов, возможно, другие виды клещей могут получить вирус Алонгшан во время совместного питания на инфицированном животном и не являться специфическими переносчиками.

Группа «*I. persulcatus*» делится на две подгруппы: европейскую (республики Карелия и Алтай, Челябинская область) и азиатскую (Китай, республики Алтай, Тыва и Карелия, Челябинская и Ульяновская области и Алтайский край). Особый интерес представляют территории Челябинской области, республик Алтай и Карелия, так как на этих территориях были выделены штаммы, относящиеся к обеим подгруппам группы «*I. persulcatus*» [158]. Штамм Galozero14-T20426 из республики Карелия появляется в различных подгруппах при филогенетическом анализе разных сегментов, что, возможно, указывает на реассортацию, как это было показано для вируса Джингмен [205]. Мы обнаружили специфические аминокислотные замены, которые позволяют различить группы «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*», а также европейские и азиатские подгруппы группы «*I. persulcatus*».

Наши результаты показывают, что штаммы вируса Алонгшан можно разделить на азиатскую и европейскую подгруппы, а также что существует четкая корреляция с клещами *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Наши результаты отличаются от данных для вируса Джингмен, у которого географическая изоляция, а не виды хозяев, является основным фактором разнообразия [135].

Эти наблюдения, а также тот факт, что изоляты от различных видов клещей принадлежат либо к группам «*I. ricinus*», либо к «*I. persulcatus*», дополнительно подтверждают идею о том, что распространение вируса Алонгшан зависит скорее от вида основного вектора, а не только от территории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флавивirusы показали способность стремительного расширения своего ареала, которое может сопровождаться более тяжелым течением болезни, изменением клинических проявлений и даже появлением дополнительных способов распространения. Особое внимание ученых привлекают границы ареала арбовирусов, т.к. на границах можно ожидать появление эпидемически значимых вариантов вирусов в связи со сменой переносчиков и основных прокормителей. В связи с этим целью данной работы было поиск и характеристика флави- и флавиподобных вирусов, циркулирующих на границе ареала ВКЭ, как наиболее распространенного переносимого клещами флавивirusа в России.

К началу нашей работы были известны обзоры и карты распространения КЭ на территории РФ [81], тем не менее, такая информация требует периодического обновления в связи с изменением границ этой инфекции, значительным улучшением диагностики и системы контроля.

Основную информацию о распространения ВКЭ можно было получить из данных Роспотребнадзора. К моменту начала данной работы большинство учреждений Роспотребнадзора использовали ИФА для выявления ВКЭ в клещах. Однако было показано, что коммерческие системы на основе ПЦР более чувствительные, чем ИФА [5]. Кроме того, в степной зоне, где никогда не регистрировали заболеваемость КЭ (Ставропольский край) учреждения Роспотребнадзора обнаруживали антиген ВКЭ в клещах при использовании ИФА [9, 17]. В связи с этим в начале работы была проведена оценка эффективности и чувствительности коммерческих тест-систем по выявлению ВКЭ на основе ИФА и ПЦР-РВ, а также ПЦР с праймерами на род *Flavivirus* (лабораторная методика). Коммерческая тест-система по выявлению ВКЭ на основе ИФА давала ложноположительные реакции с микроорганизмами присутствующими в клещах и с другими представителями рода *Flavivirus*, в отличие от коммерческой тест-системы на основе ПЦР-РВ [76]. В результате нашей работы большинство лабораторий, осуществляющих мониторинг за распространением ВКЭ, перешли на работу с использованием ПЦР взамен ИФА.

Мы еще раз показали перспективность использования панфлави праймеров для выявления флави- и флавиподобных вирусов. Для дальнейших исследований была выбрана тест-система «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей

инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс»), ПЦР со специфическими праймерами на ВКЭ [62] и ПЦР с панфлави праймерами для выявления всего спектра флавивирусов, циркулирующих в клещах на территории России.

Таким образом, мы не могли использовать ИФА и данные Роспотребнадзора на основе ИФА для оценки распространения ВКЭ. Поэтому мы составили карту на основе данных о заболеваемости КЭ и литературных данных [212]. Мы получили примерную карту ареала ВКЭ, но, несомненно, ареал ВКЭ шире, чем показано на карте.

В соответствии с ней, сборы клещей проводили на северо-западной границе распространения КЭ, где зона обитания клещей *I. ricinus*, как основного переносчика, переходит в зону симпатрии и зону, где обитает только клещи *I. persulcatus* [101], и на южной границе, где лесные зоны переходят в лесостепные (место совместного обитания клещей родов *Dermacentor* и *Ixodes*) и степные зоны, где доминируют клещи рода *Dermacentor*.

Нами было проанализировано более 7 тыс. клещей относящихся к 12 видам: *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli*, *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*, *Haemaphysalis concinna*, *Haem. punctata*, *Rhipicephalus rossicus* и *R. sanguineus* с использованием панфлави праймеров и специфичных для ВКЭ праймеров.

Мы не выявили вирус ОГЛ, вирус Повассан и вирус ШЭО. Это связано с тем, что районы исследования не являются эндемичными по этим инфекциям.

Нами был выявлен ВКЭ в клещах в районах существования активных очагов на северо-западной границе распространения в республике Карелия [116] и на южной границе – в республике Тыва [157]. Всего было детектировано 54 положительные на ВКЭ пробы (21 – *I. persulcatus*, 33 – род *Dermacentor*) и изолировано 18 штаммов, из которых 16 штаммов из *I. persulcatus*, 1 штамм из *D. nuttalli* и 1 штамм из *D. silvarum*. Все выделенные штаммы относились к сибирскому подтипу, карельские штаммы к балтийской подгруппе, а тывинские штаммы к подгруппе Васильченко. Штаммы ВКЭ из республики Карелия образуют три независимые монофилетические группы. Одна группа состоит только из штаммов из республики Карелия, две другие группируются со штаммами, выделенными как с близлежащих областей, так и удаленных на несколько сотен километров. Штаммы ВКЭ из республики Тыва образуют две монофилетические группы. В одну группу вошли только штаммы из

республики Тыва, в другой, штаммы из Тывы кластеризовались со штаммами, выделенными с близлежащих территорий, что может быть следствием заноса вируса со скотом или птицами [157]. Филогенетическая близость штаммов, изолированных в отдельных биотопах в разные годы, свидетельствует о существовании на территории республик стабильных локальных очагов ВКЭ. Наряду с этим наблюдаемое разнообразие штаммов ВКЭ, по-видимому, определяется заносом ВКЭ из соседних регионов. Популяции ВКЭ на территориях республик различаются по уровню заноса вируса. Таким образом, для предсказания эпидемиологической и эпизоотологической ситуаций на границах ареала, необходимо учитывать микроэволюционные процессы в локальных очагах и интенсивность и направление заноса вируса извне. Наиболее информативным является филогенетический анализ геномов циркулирующих в очагах вариантов ВКЭ.

В других областях исследования республике Татарстан, Ульяновской и Челябинской областях на южной границе распространения КЭ ВКЭ или другие флавивirusы обнаружены не были. Это может быть связано с тем, что в местах сбора клещей доминирующим родом являлся род *Dermacentor*, роль которого в поддержании очага КЭ до сих пор не ясна. Заболеваемость КЭ на этих территориях спорадическая, без жесткого доказательства, что инфицирование произошло после присасывания клеща рода *Dermacentor*. Хотя по нашим данным и данным других авторов [157, 217] вирусофорность клещей рода *Dermacentor* на уровне, а то и выше, вирусофорности клещей рода *Ixodes*, заболеваемость в районах преобладания клещей рода *Dermacentor* ниже. Причинами это может быть неспособность клещей рода *Dermacentor* длительно поддерживать очаг клещевого энцефалита в отсутствие клещей рода *Ixodes* или то, что в клещах рода *Dermacentor* отбирается менее вирулентный вирус. Нельзя также исключить, что на распространение ВКЭ могут влиять и другие флави- или флавиподобные вирусы. Требуются дальнейшие паразитологические, вирусологические и молекулярно-генетические исследования этого вопроса.

Нами были изолированы несколько штаммов вируса Алонгшан и получена их первичная характеристика [159]. С помощью просвечивающей электронной микроскопии нами была изучена морфология вирионов и показано, что вирионы штамма Miass527 вируса Алонгшан имеют сферическую форму размером $40,5 \pm 3,7$ нм. Нами впервые в мире было показано, что вирусы Алонгшан и Янггоу могут длительно поддерживать персистентную инфекцию (от 1 года до 3 лет) не оказывая ЦПД на клетки

клещей *I. ricinus* (IRE/CTVM19) и *Hyalomma anatolicum* (HAE/CTVM8) [158, 159]. С помощью ВПС была получена полная нуклеотидная последовательность генома четырех штаммов вируса Алонгшан, что позволило выбрать праймеры, которые позволили более эффективно выявлять эти вирусы.

Нами впервые была показана широкая распространенность на территории России сегментированных флавиподобных вирусов Алонгшан и Янгтоу, относящихся к группе Джингмен [158, 159]. Вирусы этой группы нами были обнаружены от Калининградской области на западе до Республики Тыва на востоке в клещах *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *D. nuttalli*.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков VP1a, VP1b, которые, по-видимому, являются поверхностными структурными белками, и nuORF сегмента 2, показал, что штаммы вируса Алонгшан, выделенные из разных видов клещей и человека, разделяются на группы соответственно месту обитания клещей на *I. persulcatus* и *I. ricinus*, в дальнейшем группа «*I. persulcatus*» разделяется на европейскую и азиатскую подгруппы. Подобное деление наблюдается и для ВКЭ, у которого европейский подтип ассоциирован с клещами *I. ricinus*, а сибирский и дальневосточный подтипы с клещами *I. persulcatus*. Поскольку филогенетический анализ дает информацию об основных факторах, определяющих эволюцию вируса, то аналогия между циркулирующими на одной и той же территории в популяции одних и тех же клещей вирусов КЭ и Алонгшан позволяет сделать предположение, что определяющим фактором для этих вирусов является вид основного переносчика: клещи *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Показано, что вирус Алонгшан может быть связан с заболеваниями человека [238]. Для ВКЭ известно, что европейский подтип с основным переносчиком *I. ricinus* по эпидемиологическим характеристикам отличается от сибирского и дальневосточного подтипов с основным переносчиком *I. persulcatus*. Выявленная нами схожесть деления штаммов/ампликонов вируса Алонгшан позволяет высказать предположение, что разные подгруппы этого вируса могут иметь свою эпидемиологическую специфику. Это предположение требует дальнейшего всестороннего изучения.

На территории России существуют сочетанные очаги флавивирусов и флавиподобных вирусов. На территории республик Тыва и Карелия нами были выделены вирусы Алонгшан, Янгтоу и ВКЭ из клещей, собранных на одном маршруте.

Дальнейшее изучение сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусов даст ответ о влиянии вирусов друг на друга и на течение вызываемых ими заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Ложноположительные реакции при выявлении ВКЭ в биологических материалах с помощью ИФА могут быть следствием перекрестных реакций с переносимыми клещами флавивирусами млекопитающих и перекрестных реакций с микроорганизмами, обитающими в клещах.
2. Одним из наиболее важных факторов, определяющих разнообразие вариантов ВКЭ, циркулирующего на границах ареала, является занос вирусов/клещей из других регионов. Локальные очаги ВКЭ могут значительно различаться по значимости этого фактора.
3. Показано широкое распространение сегментированных флавиподобных вирусов (вирус Алонгшан и вирус Янггоу) на территории РФ от Калининградской области на западе до республики Тыва на востоке.
4. На территории России существуют сочетанные очаги ВКЭ и флавиподобных вирусов, циркулирующих в клещах. В сборах клещей из одной точки выявлен ВКЭ и вирус Алонгшан (республики Карелия и Тыва) и ВКЭ и вирус Янггоу (республика Тыва).
5. Получена первичная вирусологическая и молекулярно-генетическая характеристика флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу. Получены полные нуклеотидные последовательности 4 геномов вируса Алонгшан и 1 генома вируса Янггоу, показана длительная персистентная инфекция в культурах клеток клещей *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM19) и *Hyalomma anatolicum* (HAE/CTVM8), описана морфология вирионов вируса Алонгшан.
6. По данным филогенетического анализа сегмента 2, кодирующего поверхностные структурные вирусные белки, показано, что основными факторами эволюции вируса являются вид основного переносчика, а также место изоляции вируса. Штаммы/ампликоны вируса Алонгшан при филогенетическом анализе разделяются в соответствии с основным видом переносчика на группы «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». В свою очередь, группа «*I. persulcatus*» разделяется на европейскую и азиатскую подгруппы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Описанные в диссертационной работе исследования по изучению циркулирующих флави- и флавиподобных вирусов на территории России требуют дальнейшего продолжения. Необходим постоянный мониторинг за изменением ареала, как переносчиков, так и вирусов. Дальнейшее изучение вирусных популяций на границах ареала позволит установить пути заноса вирусов на данные территории, спрогнозировать варианты распространения инфекции. Дальнейшее изучение роли клещей рода *Dermacentor* в поддержании очагов клещевого энцефалита позволит установить более четкие южные границы его распространения. Дальнейшее изучение циркуляции флавиподобных вирусов, потенциально опасных для человека, и существование сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусных инфекций послужит основой для коррекции профилактических и противоэпидемических мероприятий, и важно при оценке эффективности существующих и создании новых профилактических и лечебных препаратов. Необходимо изучение флавиподобных вирусов, их эволюции, патогенности и влияния на циркуляцию уже известных флавивирусов, которые являются причиной возникновения тяжелых заболеваний у человека. Полученные флавиподобные вирусы будут использованы для изучения биологических свойств, структуры их генома и способов реализации генома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	–	бляшкообразующая единица
ВКЭ	–	вирус клещевого энцефалита
ВПС	–	высокопроизводительное секвенирование
гРНК	–	геномная РНК
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	–	иммуноферментный анализ
КОЕ	–	колониеобразующая единица
КЖ	–	культуральная жидкость
КЭ	–	клещевой энцефалит
МУЗ	–	минимальный уровень заражения
нт	–	нуклеотид
н.у.м.	–	над уровнем моря
НТО	–	нетранслируемая область
ОГЛ	–	омская геморрагическая лихорадка
ОТ	–	обратная транскрипция
оц(+)-РНК	–	одноцепочечная положительной полярности РНК
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	–	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РРИО	–	коммерческий раствор для разведения исследуемых образцов
СПЭВ	–	перевиваемая культура клеток почек эмбриона свиньи
ТАЕ	–	трис-ацетатный буфер
УЦФ	–	ультрацентрифугирование
ЦПД	–	цитопатическое действие
ШЭО	–	шотландский энцефаломиелит овец
ЭПР	–	эндоплазматический ретикулум
IRE/CTVM19	–	перевиваемая культура клеток клещей <i>Ixodes ricinus</i>
НАЕ/CTVM8	–	перевиваемая культура клеток клещей <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>
nuORF	–	новая открытая рамка считывания
Vero	–	перевиваемая культура эпителиальных клеток почки

африканской зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адищева О.С. Распространение Лихорадки Западного Нила В России / Адищева О.С., Малхазова С.М., Орлов Д.С. // Вестник Московского Университета. Серия 5. География – 2016. – Т. 4 – С.48–54.
2. Алексеев А.Н. Различия в дистантной передаче вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами двух подсемейств / Алексеев А.Н., Чунихин С.П. // Паразитология – 1992. – Т. 26 – № 6 – С.506–515.
3. Алексеев А.Н. Обмен вирусом между питающимися клещами при отсутствии вирусемии у позвоночного хозяина (дистантная передача) / Алексеев А.Н., Чунихин С.П. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1991. – Т. 2 – С.50–54.
4. Балашов Ю.С. Иксодовые клещи – паразиты и переносчики инфекций / Ю. С. Балашов – Санкт-Петербург: Наука, 1998.– 285с.
5. Белова О.А. Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени / Белова О.А., Буренкова Л.А., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Топычканова Н.Г., Кувшинова И.Н., Тимофеев Д.И., Рукавишников М.Ю., Гришаев М.П., Карганова Г.Г. // Вопросы вирусологии – 2014. – Т. 59 – № 5 – С.38–43.
6. Белова О.А. Способность иксодовых клещей (Acari: Ixodidae) разных видов поддерживать репродукцию вируса клещевого энцефалита / Белова О.А., Холодилов И.С., Литов А.Г., Карганова Г.Г. // Паразитология – 2018. – № 4 – С.268–282.
7. Бируля Н.Б. О таксономических единицах в классификации клещевого энцефалита / Бируля Н.Б., Залуцкая Л.И. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1959. – Т. 6 – С.667–675.
8. Валицкая А.В. Сравнительное изучение роли различных видов иксодовых клещей (*Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*) в эпидемиологическом процессе при клещевом энцефалите в западной части Западной Сибири / А.В. Валицкая, А.А. Катин, Е.А. Брагина, В.А. Шуман // VIII Международная научная конференция "Чтения памяти проф. И.И. Барабаш-Никифорова". Воронежский государственный университет.

– Воронеж, 2016. – С.21–26.

9. Василенко Н.Ф. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых трансмиссивных инфекций в регионе Кавказских Минеральных вод Ставропольского Края / Василенко Н.Ф., Ермаков А.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. // Здоровье населения и среда обитания – 2014. – Т. 5 – № 254 – С.28–30.
10. Васина А.Р. Распространенность клещевого вирусного энцефалита на территории Ульяновской области // X Международная научно-практическая конференция «Новое Слово в Науке: Перспективы Развития». ЦНС «Интерактив плюс». – Чебоксары, 2016. – С.2–4.
11. Вожакина Н.В. Очаг клещевого энцефалита с основным переносчиком *Haemaphysalis concinna* Koch. в условиях Красноярского края. / Вожакина Н.В. // Труды Омского института эпидемиологии, микробиологии и гигиены – 1954. – Т. 2.
12. Гасилин В.В. Иксодовые клещи – переносчики природно-очаговых инфекций и современная эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту и иксодовому клещевому боррелиозу (болезни Лайма) в Республике Татарстан / Гасилин В.В., Хакимзянова М.В., Таненкова Е.В., Нугманова А.И., Кармазина И.О. // Медицинские науки – 2013. – Т. 7 – С.46–50.
13. Деменев В.А. Японский энцефалит как возвращающаяся арбовирусная нейроинфекция на приграничных территориях Дальнего Востока России и Китая / Деменев В.А., Фенмин Ч., Макарова Т.Е., Хуанюй В., Савин С.З., Янь Л. // Здравоохранение Дальнего Востока – 2016. – Т. 68 – № 2 – С.52–57.
14. Демина Т.В. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования / Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Парамонов А.И., Злобин В.И. // Вопросы Вирусологии – 2012. – Т. 57 – № 4 – С.13–18.
15. Елкин И.И. Проблемы эпидемиологической географии / Елкин И.И., Яшкуль В.К. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 1964. – Т. 9.
16. Емельянова Н.Д. Материалы к изучению эктопаразитов млекопитающих Тувы / Емельянова Н.Д., Жовты И.Ф., Терещенко О.Н., Короткова Г.В. // Доклады Иркутского

противочумного института – 1962. – Т. 4 – С.160–164.

17. Ермаков А.В. Иммунологический мониторинг за трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями на территории Кавказских Минеральных Вод / Ермаков А.В., Василенко Н.Ф., Варфаломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Волюнкина А.С., Заикина И.Н., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. // Медицинский вестник Северного Кавказа – 2012. – Т. 1 – С.43–46.
18. Жмаева З.М. Клеци Ixodoidae и вирусы комплекса клещевого энцефалита / З.М. Жмаева, А.А. Пчелкина // Биологические взаимодействия между переносчиком и возбудителем болезней / ред. П.А. Петрищева. – Москва, 1967. – С.32–85.
19. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики / Злобин В.И. // Terra medica – 2010. – Т. 61 – № 2 – С.13–21.
20. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири / В. И. Злобин, В. А. Борисов, М. М. Верхозина, И. В. Малов, Г. Н. Холмогорова – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2002.– 184с.
21. Злобин В.И. Клещевой энцефалит : Этиология. Эпидемиология и профилактика в Сибири / В. И. Злобин, О. З. Горин – Новосибирск: Наука, Сибирская издательская фирма РАН, 1996.– 177с.
22. Злобин В.И. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е / Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В., Бутина Т.В., Беликов С.И., Горин О.З., Джигоев Ю.П., Верхозина М.М., Козлова И.В., Воронко И.В., Адельшин Р.В., Грачев М.А. // Вопросы вирусологии – 2001. – Т. 46 – № 1 – С.12–16.
23. Калущкова Н.Н. Ульяновская область// Большая российская энциклопедия [Электронный ресурс]. URL: <https://bigenc.ru/geography/text/5781397>.
24. Ковалев С.Ю. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вируса клещевого энцефалита на территории Свердловской области на основе генотипоспецифической ОТ-ПЦР / Ковалев С.Ю., Умпелева Т.В., Снитковская Т.Э., Килячина А.С., Романенко В.В., Кокорев В.С., Глинских Н.П. // Вопросы вирусологии –

2008. – Т. 53 – № 2 – С.27–31.

25. Козлова А.А. Результаты вирусологического обследования клинических материалов от больных острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии / Козлова А.А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Вашкова В.В., Сайфуллин М.А., Азарян А., Гришанова А.П., Иващенко Е.И., Гуцин В.А., Щетинин А.М., Никифорова М.А., Климентов А.С., Альховский С.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2018. – Т. 23 – № 6 – С.286–293.

26. Козлова А.А. Изучение ареала вируса Западного Нила на территории европейской части России; результаты сероэпидемиологических исследований. Сообщение 2: Центральный, Приволжский и Северо-Западный федеральные округа. / Козлова А.А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Вашкова В.В., Дзагурова Т.К., Елисеева С.М., Зорина Д.М., Корабельникова М.И., Кудрявцева Е.Н., Лебедева С.Д., Лесникова М.В., Недия Н.В., Соколова М.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2017. – Т. 22 – № 2 – С.52–57.

27. Кондрашова З.Н. Изучение сохранения вируса омской геморрагической лихорадки в клещах *Ixodes persulcatus* при условии их массивного дозированного заражения / Кондрашова З.Н. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1970. – Т. 3 – С.274–278.

28. Коренберг Э.И. Биохорологическая структура вида (на примере таежного клеща) / Э. И. Коренберг / ред. В.Е. Флинт. – Москва: Наука, 1979. – 172с.

29. Коренберг Э.И. Распространение таежного клеща (*Ixodes persulcatus*) в СССР / Коренберг Э.И., Жуков В.И., Шаткаускас А.В., Бушуева Л.К. // Зоологический журнал – 1969. – Т. 48 – № 7 – С.1003–1014.

30. Коренберг Э.И. Районирование ареала клещевого энцефалита / Э.И. Коренберг, Ю.В. Ковалевский // Итоги Науки и Техники, “Медицинская География.” ВИНТИ АН СССР / ред. В.Ю. Литвин. – Москва, 1981. – С.148.

31. Куренков В.Б. Экспериментальная характеристика таежного клеща (*Ixodes persulcatus*) в качестве переносчика вируса клещевого энцефалита / Куренков В.Б., Чунихин С.П., Кочеткова Г.А. // Медицинская паразитология – 1981. – Т. 1 – С.53–58.

32. Кучерук В.В. Опыт классификации природных очагов чумы внетропической Евразии. Сообщение 1. Принципы типологии и классификации природных очагов инфекций. / Кучерук В.В. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1959. – Т. 6.
33. Кучерук В.В. Клещевой энцефалит / В.В. Кучерук, Л.М. Иванова, В.М. Неров // География природно-очаговых болезней человека в связи с задачами их профилактики / ред. П.А. Петрищева, Н.Г. Олсуфьев. – Москва: Медицина, 1969. – С.171–238.
34. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты / Г. Н. Леонова – Москва: Издатель И.В. Балабанов, 2009. – 168с.
35. Леонова Г.Н. Энцефалит Повассан на Дальнем Востоке / Леонова Г.Н. // Тихоокеанский медицинский журнал – 2001. – Т. 2 – С.83–87.
36. Леонова Г.Н. Изучение роли вируса Повассан в этиологической структуре клещевого энцефалита в Приморском крае / Леонова Г.Н., Исачкова Л.М., Баранов Н.И. // Вопросы вирусологии – 1980. – Т. 2 – С.173–176.
37. Леонова Г.Н. Клинико-эпидемиологические особенности энцефалита Повассан, изолированных на юге Советского Дальнего Востока / Леонова Г.Н., Сорокина М.Н., Кругляк С.П. // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии – 1991. – Т. 3 – С.35–39.
38. Логинова Н.В. Биологическая характеристика коллекционных штаммов вирусов группы японского энцефалита / Логинова Н.В., Дерябин П.Г., Вашкова В.В. // Вопросы вирусологии – 2015. – Т. 60 – № 1 – С.17–20.
39. Лучинина С.В. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Челябинской области / Лучинина С.В., Степанова О.Н., Погодина В.В., Стенько Е.А., Чиркова Г.Г., Герасимов С.Г., Колесникова Л.И. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика – 2014. – Т. 136 – № 8 – С.1305–1309.
40. Лучинина С.В. Роль клещей рода *Dermacentor* в передаче вируса клещевого энцефалита в Южном Урале / С.В. Лучинина, И.В. Фельдблюм, Н.М. Усольцева // Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней. – Тюмень, 2015. – С.202–206.

41. Львов Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Львов Д.К., Злобин В.И. // Вопросы вирусологии – 2007. – Т. 52 – № 5 – С.26–30.
42. Маскаев Ю.М. Геоботаническое районирование / Ю.М. Маскаев, Б.Б. Намзалов, В.П. Седельников // Растительный покров и естественные кормовые угодья Тувинской АССР / ред. И.Ю. Коропачинский. – Новосибирск: Наука, 1985. – С.210–247.
43. Маянский Н.А. MALFI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории / Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. // Вопросы диагностики в педиатрии – 2011. – Т. 3 – № 5 – С.20–25.
44. Мельникова О.В. Обследование территории Республики Тыва на некоторые клещевые природно-очаговые инфекции / Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Трушина Ю.Н., Сидорова Е.А., Худченко С.Э., Андаев Е.И., Галацевич Н.Ф., Чумаков А.В., Чумакова Н.А., Лесных С.И. // Инфекционные болезни – 2014. – Т. 12 – № 4 – С.48–55.
45. Микрюкова Т.П. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в Северо-Восточном регионе Европейской части России / Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. // Паразитология – 2014. – Т. 48 – № 2 – С.131–149.
46. Морозов В.Г. Эпидемиологическая характеристика природных очагов клещевого энцефалита и боррелиоза на территории Жигулевского заповедника / Морозов В.Г., Краснобаев Ю.П., Буренкова Л.А., Пиванова Г.П., Шевцова А.С., Романова Л.Ю., Морозов А.В. // Самарская Лука – 2009. – Т. 18 – № 4 – С.106–112.
47. МУ 3.1.3012-12. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней. – Утвержден 2012-04-04. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора России, 2012.– 55с.
48. Наумов Р.Л. Иксодовые клещи и возбудитель клещевого энцефалита. Сообщение 3. Обобщение данных и некоторые выводы / Наумов Р.Л., Гутова В.П., Чунихин С.П. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1981. – Т. 1 – С.58–61.

49. Неров В.М. Опыт создания карт структуры ареала клещевого энцефалита на территории РСФСР и некоторые методические вопросы их составления / В.М. Неров, Л.М. Иванова // Методы медико-биологических исследований. Московский филиал географического общества Союза ССР. Комиссия медицинской географии / ред. В.М. Неронов. – Москва, 1965. – С.149–157.
50. Нецкий Г.И. О распространении и взаимоотношениях очагов клещевого энцефалита, клещевого сыпного тифа Северной Азии и лихорадки Ку в Западной Сибири / Нецкий Г.И., Шайман М.С. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1964. – Т. 2 – С.136–141.
51. ОФС. 1.2.3.0012.15 Определение белка. – Введ. 2015-10-29. – Москва.: Министерства здравоохранения РФ, 2015. – С.16.
52. Панферова Ю.А. Бактериальные и вирусные патогены в клещах *Ixodes* sp. на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области / Панферова Ю.А., Суворова М.А., Шапарь А.О., Токаревич Н.К. // Инфекция и иммунитет – 2018. – Т. 8 – № 2 – С.219–222.
53. Петрищева П.А. Методы изучения природных очагов болезней человека / П. А. Петрищева, Н. Г. Олсуфьев – Москва, 1964. – 307с.
54. Погодина В.В. Ревизия очагов японского энцефалита и серологическая характеристика современной ситуации в Приморском крае / Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Поленова И.Н. // Медицинская вирусология. Труды ИПВЭ АМН СССР – 1974. – Т. 22 – С.107–114.
55. Полиенко А.Е. Характеристика вируса Lamti, выделенного из пула комаров *Aedes cinereus*, собранных в Санкт-Петербурге / А.Е. Полиенко, И.С. Холодилов, С.В. Айбулатов, А.В. Халин, А.С. Климентов, О.А. Белова, С.Г. Медведев, А.П. Гмыль, Г.Г. Карганова // Современные проблемы общей и частной паразитологии. II Международный паразитологический форум. Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 224–226.
56. Природно-географическая специфика Карелии [Электронный ресурс]. URL: <http://nmrk.karelia.ru/site/section/271>.

57. Протопопова Е.В. Выделение клеточного рецептора для вируса клещевого энцефалита при помощи антиидиотипических антител / Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Локтев В.Б. // Вопросы вирусологии – 1997. – Т. 42 – № 6 – С.264–268.
58. Путинцева Е.В. Результаты мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз развития эпидемической ситуации на 2020 г / Путинцева Е.В., Алексейчик И.О., Чеснокова С.Н., Удовиченко С.К., Бородай Н.В., Никитин Д.Н., Агаркова Е.А., Батулин А.А., Шпак И.М., Фомина В.К., Несговорова А.В., Смелянский В.П., Викторов Д.В., Топорков А.В. // Проблемы особо опасных инфекций – 2020. – Т. 28 – № 1 – С.51–60.
59. Путинцева Е.В. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 году / Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Мананков В.В., Погасий Н.И., Злепко А.В., Чайка А.Н., Крючкова Т.П., Савченко С.Т., Жуков К.В. // Проблемы особо опасных инфекций – 2011. – Т. 54 – № 6 – С.453–453.
60. Республика Карелия [Электронный ресурс]. URL: https://petrozavodsk.mid.ru/ru/international/respublika_kareliya/.
61. Романенко В.Н. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей, вирусом клещевого энцефалита на территории города Томска и его окрестностей / Романенко В.Н., Кондратьева Л.М. // Паразитология – 2011. – Т. 45 – № 1 – С.3–10.
62. Романова Л.Ю. Метод доказательства отсутствия РНК вируса клещевого энцефалита в биопробах / Романова Л.Ю., Козловская Л.И., Шевцова А.С., Карганова Г.Г. // Вопросы вирусологии – 2006. – Т. 51 – № 1 – С.38–41.
63. Роспотребнадзор. Перечень административных территорий субъектов Российской Федерации, эндемичных по клещевому вирусному энцефалиту в 2020 году [Электронный ресурс]. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=16919.
64. Рудаков Н.В. Эпидемиология омской геморрагической лихорадки / Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Яки // Эпидемиология и вакцинопрофилактика – 2015. – Т. 80 – № 1 – С.39–48.

65. Сергеев А.М. Клещевой энцефалит и лайм-боррелиоз в республике Карелия (современные аспекты клиники и эпидемиологии) / Сергеев А.М., Скоромец А.А., Сергеева А.А., Коваленко А.И., Бондаренко Г.Е. // Ученые записки Петрозаводского Государственного Университета – 2015. – Т. 4 – С.34–36.
66. Соколова О.В. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита в Архангельской области / Соколова О.В., Чашин В.П., Попова О.Н., Бузинов Р.В., Пасынкова М.М., Гудков А.Б. // Экология человека – 2017. – Т. 4 – С.12–19.
67. Татарстан. Географическое положение и климат Республики Татарстан [Электронный ресурс]. URL: <https://tatarstan.ru/about/geography.htm>.
68. Терехина Л.Л. Возможности выявления РНК вируса омской геморрагической лихорадки с помощью универсальных для флавивирусов праймеров и тест-систем для диагностики ВКЭ / Терехина Л.Л., Романова Л.Ю. // Медицинская вирусология – 2008. – Т. 25 – С.151–157.
69. Терновой В.А. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России / Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенцова А.О., Зайковская А.В., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Агафонов А.П., Локтев В.Б. // Вестник РАМН – 2020. – Т. 75 – № 2 – С.129–134.
70. Токаревич Н.К. Энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов (Болезни Лайма) в Калининградской области / Токаревич Н.К., Тронин А.А., Селюк В.Н., Груничева Т.П., Бабура Е.А. // Инфекция и иммунитет – 2011. – Т. 36 – № 812 – С.319–330.
71. Туристско-краеведческая характеристика Калининградской области [Электронный ресурс]. URL: <http://www.refsr.ru/referat-11228-3.html>
72. Тыва. Физико-географическая характеристика Республики Тыва [Электронный ресурс]. URL: <https://rtyva.ru/region/geography/>.
73. Филиппова Н.А. Фауна СССР. Новая серия, №114. Паукообразные. Т.4. Вып. 4. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae / Н. А. Филиппова / ред. О.А. Скарлато. – Ленинград: Наука, 1977.
74. Филиппова Н.А. Фауна России и сопредельных стран: Arachnoidea: Том IV,

выпуск 5, Иксодовые клещи подсемейства Amblyomminae / Н. А. Филиппова – Санкт-Петербург: Наука, 1997.

75. Хазова Т.Г. Сочетанный очаг клещевого энцефалита, клещевого риккетсиоза и туляремии в ареале клещей *Haemaphysalis concinna* на юге Центральной Сибири / Хазова Т.Г., Ястребов В.К. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2001. – Т. 1 – С.78–80.

76. Холодилов И.С. Оценка зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита с использованием различных методов исследования. Неоднозначность трактовки результатов. / Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузова О.В., Гмыль А.П., Романова Л.Ю., Бойко В.А., Крючков Р.А., Орлова О.Е., Пакскина Н.Д., Шамсутдинов А.Ф., Карганова Г.Г. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика – 2014. – Т. 3 – № 76 – С.29–36.

77. Общая характеристика Челябинской области. [Электронный ресурс]. URL: <https://chelreglib.ru/ru/pages/kray/chelregion/general/>

78. Чернохаева Л.Л. Современный ареал клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации / Чернохаева Л.Л., Холодилов И.С., Пакскина Н.Д. // Медицинская вирусология – 2016. – Т. 30 – № 1 – С.6–22.

79. Чунихин С.П. Экология и географическое распространение арбовирусов / С. П. Чунихин, Г. Н. Леонова – Москва: Медицина, 1985. – 127с.

80. Шальнев В.А. Ставропольский край / В.А. Шальнев // Большая советская энциклопедия. [Электронный ресурс]. URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/bse/135461/>

81. Эндемичные по клещевому энцефалиту территории России [Электронный ресурс]. URL: www.encephalitis.ru.

82. Ястребов В.К. Омская геморрагическая лихорадка: итоги исследований (1946 - 2013 гг.) / Ястребов В.К., Якименко В.В. // Вопросы вирусологии – 2014. – Т. 59 – № 6 – С.5–11.

83. Acosta E.G. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells / Acosta E.G., Castilla V., Damonte E.B. // Cellular Microbiology – 2009. – V. 11 – № 10 – P.1533–1549.

84. Alcalá A.C. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently from infected mosquito cells / Alcalá A.C., Medina F., González-Robles A., Salazar-Villatoro L., Fragoso-Soriano R.J., Vásquez C., Cervantes-Salazar M., Angel R.M. del, Ludert J.E. // *Virology* – 2016. – V. 488 – P.278–287.
85. Alekseev A.N. Tick-Borne borreliosis pathogen identification in ixodes ticks (Acarina, Ixodidae) collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia / Alekseev A.N., Dubinina H. V., Antykova L.P., Dzhivanyan T.I., Rijpkema S.G.T., Verbeek-De Kruif N., Cinco M. // *Journal of Medical Entomology* – 1998. – V. 35 – № 2 – P.136–142.
86. Andreassen A. Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway / Andreassen A., Jore S., Cuber P., Dudman S., Tengs T., Isaksen K., Hygen H.O., Viljugrein H., Ånestad G., Ottesen P., Vainio K. // *Parasites and Vectors* – 2012. – V. 5 – № 1 – P.1–12.
87. Balseiro A. Louping ill in goats, Spain 2011 / Balseiro A., Royo L.J., Martínez C.P., Mera I.G.F. De, Höfl Ú., Polledo L., Marreros N., Casais R., Marín J.F.G. // *Emerging infectious diseases* – 2012. – V. 18 – № 6 – P.2011–2013.
88. Bankevich A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. // *Journal of Computational Biology* – 2012. – V. 19 – № 5 – P.455–477.
89. Bell-Sakyi L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* / Bell-Sakyi L. // *The journal of parasitology* – 1991. – V. 77 – № 6 – P.1006–1008.
90. Bell-Sakyi L. Virus discovery using tick cell lines / Bell-Sakyi L., Attoui H. // *Evolutionary Bioinformatics* – 2016. – V. 12 – P.31–34.
91. Bell-Sakyi L. Tick cell lines for study of crimean-congo hemorrhagic fever virus and other arboviruses / Bell-Sakyi L., Kohl A., Bente D.A., Fazakerley J.K. // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* – 2012. – V. 12 – № 9 – P.769–781.
92. Bell-Sakyi L. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research / Bell-Sakyi L., Zwegarth E., Blouin E.F., Gould E.A., Jongejan F. // *Trends in Parasitology* – 2007. – V.

23 – № 9 – P.450–457.

93. Belova O.A. Problem of TBE virus prevalence evaluation in natural populations of *Dermacentor* ticks / O.A. Belova, S.A. Brisker, L.S. Karan, N.M. Kolyasnikova, N.G. Topichkanova, I.N. Kuvshinova, D.I. Timofeyev, M.Y. Rukavishnikov, M.P. Grishayev, G.G. Karganova // XII International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases (IJSTD-XII2013). – Weimar, 2013. – P.22.
94. Belova O.A. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks - Evidence of virus replication and changes in tick behavior / Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2012. – V. 3 – № 4 – P.240–246.
95. Belova O.A. The ability of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) to support reproduction of the tick-borne encephalitis virus / Belova O.A., Kholodilov I.S., Litov A.G., Karganova G.G. // Entomological Review – 2018. – V. 98 – № 9.
96. Belova O.A. Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines / Belova O.A., Litov A.G., Kholodilov I.S., Kozlovskaya L.I., Bell-Sakyi L., Romanova L.I., Karganova G.G. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2017. – V. 8 – № 6 – P.895–906.
97. Biernat B. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland / Biernat B., Karbowiak G., Werszko J., Stańczak J. // Experimental and Applied Acarology – 2014. – V. 64 – № 4 – P.543–551.
98. Blitvich B.J. A review of flaviviruses that have no known arthropod vector / Blitvich B.J., Firth A.E. // Viruses – 2017. – V. 9 – № 6 – P.1–25.
99. Bogovic P. What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms / Bogovic P., Lotric-Furlan S., Strle F. // Travel Medicine and Infectious Disease – 2010. – V. 8 – № 4 – P.246–250.
100. Brackney D.E. Short report: Stable prevalence of powassan virus in *Ixodes scapularis* in a Northern Wisconsin focus / Brackney D.E., Nofchissey R.A., Fitzpatrick K.A., Brown I.K., Ebel G.D. // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene – 2008. – V. 79 – № 6 –

P.971–973.

101. Bugmyrin S. V. Distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* ticks in southern Karelia (Russia) / Bugmyrin S. V., Bespyatova L.A., Korotkov Y.S., Burenkova L.A., Belova O.A., Romanova L.I., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Ieshko E.P. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2013. – V. 4 – № 1–2 – P.57–62.
102. Calisher C.H. West Nile Virus in the New World: Appearance, persistence, and adaptation to a new econiche—an opportunity taken / Calisher C.H. // Viral Immunology – 2000. – V. 13 – № 4 – P.411–414.
103. Calisher C.H. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera / Calisher C.H., Karabatsos N., Dalrymple J.M., Shope R.E., Porterfield J.S., Westaway E.G., Brandt W.E. // Journal of General Virology – 1989. – V. 70 – № 1 – P.37–43.
104. Callister D.M. Four abundant novel transcript genes from *Toxocara canis* with unrelated coding sequences share untranslated region tracts implicated in the control of gene expression / Callister D.M., Winter A.D., Page A.P., Maizels R.M. // Molecular and Biochemical Parasitology – 2008. – V. 162 – № 1 – P.60–70.
105. Campbell G.L. Epidemic West Nile encephalitis in Romania waiting for history to repeat itself / Campbell G.L., Ceianu C.S., Savage H.M. // Annals of the New York Academy of Sciences – 2001. – V. 951 – № 970 – P.94–101.
106. Campbell M.S. Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence / Campbell M.S., Pletnev A.G. // Virology – 2000. – V. 269 – № 1 – P.225–237.
107. Centers for Disease Control and Prevention Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999 / Centers for Disease Control and Prevention // Morbidity and Mortality Weekly Report – 1999. – V. 48 – № 38 – P.845–849.
108. Chancey C. The global ecology and epidemiology of west nile virus / Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. // BioMed Research International – 2015. – V. 2015 – P.376230.
109. Charrel R.N. Prevalence of antibody against West Nile virus in volunteer blood donors

living in southeastern France / Charrel R.N., Lamballerie X. de, Durand J.P., Gallian P., Attoui H., Biagini P., Micco P. De // *Transfusion* – 2001. – V. 41 – № 10 – P.1320–1321.

110. Chu J.J.H. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway / Chu J.J.H., Ng M.L. // *Journal of Virology* – 2004. – V. 78 – № 19 – P.10543–10555.

111. Dai X. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China article / Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. // *Emerging Microbes and Infections* – 2018. – V. 7 – № 1.

112. Danielová V. Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonose mountains, Czech Republic). / Danielová V., Daniel M., Schwarzová L., Materna J., Rudenko N., Golovchenko M., Holubová J., Grubhoffer L., Kilián P. // *Vector borne and zoonotic diseases* – 2010. – V. 10 – № 3 – P.223–230.

113. Deardorff E.R. Powassan virus in mammals, Alaska and New Mexico, USA, and Russia, 2004-2007 / Deardorff E.R., Nofchissey R.A., Cook J.A., Hope A.G., Tsvetkova A., Talbot S.L., Ebel G.D. // *Emerging Infectious Diseases* – 2013. – V. 19 – № 12 – P.2012–2016.

114. Demina T.V. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes / Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Zlobin V.I. // *Journal of Medical Virology* – 2010. – V. 82 – P.965–976.

115. Deviatkin A.A. TBEV subtyping in terms of genetic distance / Deviatkin A.A., Karganova G.G., Vakulenko Y.A., Lukashev A.N. // *Viruses* – 2020a. – V. 12 – № 11 – P.1–12.

116. Deviatkin A.A. Baltic group tick-borne encephalitis virus phylogeography: systemic inconsistency pattern between genetic and geographic distances / Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Belova O.A., Bugmyrin S. V., Bespyatova L.A., Ivannikova A.Y., Vakulenko Y.A., Lukashev A.N., Karganova G.G. // *Microorganisms* – 2020b. – V. 8 – № 10 – P.1589.

117. Deviatkin A.A. Tick-borne encephalitis virus: An emerging ancient zoonosis? /

Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Vakulenko Y.A., Karganova G.G., Lukashev A.N. // *Viruses* – 2020c. – V. 12 – № 2.

118. Dinçer E. Survey and characterization of jingmen tick virus variants / Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., Emanet N., Brinkmann A., Nitsche A., Özkul A., Linton Y.-M., Ergünay K. // *Viruses* – 2019. – V. 11 – № 11 – P.1071.

119. Dobler G. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis / Dobler G., Gniel D., Petermann R., Pfeffer M. // *Wiener Medizinische Wochenschrift* – 2012. – V. 162 – № 11–12 – P.230–238.

120. Dupuis A.P. Isolation of deer tick virus (Powassan virus, lineage II) from *Ixodes scapularis* and detection of antibody in vertebrate hosts sampled in the Hudson Valley, New York State / Dupuis A.P., Peters R.J., Prusinski M.A., Falco R.C., Ostfeld R.S., Kramer L.D. // *Parasites and Vectors* – 2013. – V. 6 – № 1 – P.1–11.

121. Ebel G.D. A focus of deer tick virus transmission in the Northcentral United States / Ebel G.D., Foppa I., Spielman A., Telford S.R. // *Emerging Infectious Diseases* – 1999. – V. 5 – № 4 – P.570–574.

122. Ecker M. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. // *Journal of General Virology* – 1999. – V. 80 – № 1 – P.179–185.

123. Emmerich P. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo / Emmerich P., Jakupi X., Possel R. von, Berisha L., Halili B., Günther S., Cadar D., Ahmeti S., Schmidt-Chanasit J. // *Infection, Genetics and Evolution* – 2018. – V. 65 – P.6–11.

124. Erlanger T.E. Past, present, and future of Japanese encephalitis / Erlanger T.E., Weiss S., Keiser J., Utzinger J., Wiedenmayer K. // *Emerging Infectious Diseases* – 2009. – V. 15 – № 1 – P.1–7.

125. Family Flaviviridae // *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / Eds. A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz. – New York: Elsevier, 2012. – P.1003–1020.

126. Filgueira L. Review of emerging japanese encephalitis virus: New aspects and concepts

about entry into the brain and inter-cellular spreading / Filgueira L., Lannes N. // *Pathogens* – 2019. – V. 8 – № 3.

127. Földvári G. *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise / Földvári G., Šíroký P., Szekeres S., Majoros G., Sprong H. // *Parasites and Vectors* – 2016. – V. 9 – № 1 – P.1–29.

128. Füzik T. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / Füzik T., Formanová P., Růžek D., Yoshii K., Niedrig M., Plevka P. // *Nature Communications* – 2018. – V. 9 – № 1 – P.1–11.

129. Gao G.F. Sequencing and antigenic studies of a Norwegian virus isolated from encephalomyelitic sheep confirm the existence of louping ill virus outside Great Britain and Ireland / Gao G.F., Jiang W.R., Hussain M.H., Venugopal K., Gritsun T.S., Reid H.W., Gould E.A. // *Journal of General Virology* – 1993. – V. 74 – № 1 – P.109–114.

130. Garcia-Blanco M.A. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication / Garcia-Blanco M.A., Vasudevan S.G., Bradrick S.S., Nicchitta C. // *Antiviral Research* – 2016. – V. 134 – P.244–249.

131. Gilbert L. Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control / Gilbert L. // *Experimental and Applied Acarology* – 2016. – V. 68 – № 3 – P.363–374.

132. Grard G. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy / Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., Lamballerie X. de // *Virology* – 2007. – V. 361 – № 1 – P.80–92.

133. Greig J.R. The nature of louping ill / Greig J.R., Brownlee A., Wilson D.R., Gordon W.S. // *Veterinary Record* – 1931. – V. 11 – P.325–333.

134. Gritsun T.S. Tick-borne Flaviviruses / Gritsun T.S., Nuttall P.A., Gould E.A. // *Advances in Virus Research* – 2003. – V. 61 – P.317–371.

135. Guo J.-J. Diversity and circulation of Jingmen tick virus in ticks and mammals / Guo J.-J., Lin X.-D., Chen Y.-M., Hao Z.-Y., Wang Z.-X., Yu Z.-M., Lu M., Li K., Qin X.-C., Wang W., Holmes E.C., Hou W., Zhang Y.-Z. // *Virus Evolution* – 2020. – V. 6 – № 2 – P.1–12.

136. Hall R.A. Kunjin virus: An Australian variant of West Nile? / Hall R.A., Scherret J.H., Mackenzie J.S. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2001. – V. 951 – P.153–160.
137. Han X. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. / Han X., Aho M., Vene S., Peltomaa M., Vaheri A., Vapalahti O. // *Journal of medical virology* – 2001. – V. 64 – № 1 – P.21–28.
138. Heinz F.X. Flavivirus structure and membrane fusion / Heinz F.X., Allison S.L. // *Advances in Virus Research* – 2003. – V. 59 – P.63–97.
139. Holzmann H. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria / Holzmann H., Aberle S.W., Stiasny K., Werner P., Mischak A., Zainer B., Netzer M., Koppi S., Bechter E., Heinz F.X. // *Emerging Infectious Diseases* – 2009. – V. 15 – № 10 – P.1671–1673.
140. Hoogstraal H. Ticks in relation to human diseases caused by viruses / Hoogstraal H. // *Annual Review of Entomology* – 1966. – V. 11 – P.261–308.
141. Huhtamo E. Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses / Huhtamo E., Cook S., Moureau G., Uzcátegui N.Y., Sironen T., Kuivanen S., Putkuri N., Kurkela S., Harbach R.E., Firth A.E., Vapalahti O., Gould E.A., Lamballerie X. de // *Virology* – 2014. – V. 464–465 – № 1 – P.320–329.
142. Huhtamo E. characterization of a novel flavivirus from mosquitoes in Northern Europe that is related to mosquito-borne flaviviruses of the tropics / Huhtamo E., Putkuri N., Kurkela S., Manni T., Vaheri A., Vapalahti O., Uzcategui N.Y. // *Journal of Virology* – 2009. – V. 83 – № 18 – P.9532–9540.
143. International Committee on Taxonomy of Viruses Genus: Flavivirus [Электронный ресурс]. URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus.
144. Jääskeläinen A. Siberian subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* in a newly emerged focus, Finland / Jääskeläinen A., Tonteri E., Pieninkeroinen I., Sironen T., Voutilainen L., Kuusi M., Vaheri A., Vapalahti O. // *Ticks and Tick-borne Diseases* – 2016. –

V. 7 – № 1 – P.216–223.

145. Jääskeläinen A.E. Tick-borne encephalitis virus in ticks in Finland, Russian Karelia and Buryatia / Jääskeläinen A.E., Sironen T., Murueva G.B., Subbotina N., Alekseev A.N., Castrén J., Alitalo I., Vaheri A., Vapalahti O. // Journal of General Virology – 2010. – V. 91 – № 11 – P.2706–2712.

146. Jääskeläinen A.E. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland / Jääskeläinen A.E., Tikkakoski T., Uzcátegui N.Y., Alekseev A.N., Vaheri A., Vapalahti O. // Emerging Infectious Diseases – 2006. – V. 12 – № 10 – P.1568–1571.

147. Jääskeläinen A.E. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks / Jääskeläinen A.E., Tonter E., Sironen T., Pakarinen L., Vaheri A., Vapalahti O. // Emerging Infectious Diseases – 2011. – V. 17 – № 2 – P.323–325.

148. Jaenson T.G.T. First records of tick-borne pathogens in populations of the taiga tick *Ixodes persulcatus* in Sweden / Jaenson T.G.T., Wilhelmsson P. // Parasites and Vectors – 2019. – V. 12 – № 1 – P.1–12.

149. Jeffries C.L. Louping ill virus: An endemic tick-borne disease of Great Britain / Jeffries C.L., Mansfield K.L., Phipps L.P., Wakeley P.R., Mearns R., Schock A., Bell S., Breed A.C., Fooks A.R., Johnson N. // Journal of General Virology – 2014. – V. 95 – № PART 5 – P.1005–1014.

150. Jensen P.M. Densities of the tick (*Ixodes ricinus*) and coexistence of the Louping ill virus and tick borne encephalitis on the island of Bornholm / Jensen P.M., Skarphedinsson S., Semenov A. // Ugeskrift for Laeger – 2004. – V. 166 – № 26–31 – P.2563–2565.

151. Jia N. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study / Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., Li J., Jiang B.G., Wang Q., Sun Y., Wei R., Yuan T.T., Xia L.Y., Chu Y.L., Wei W., Li L.F., Ye J.L., Lv Q.Y., Cui X.M., Guan Y., Tong Y.G., Jiang J.F., Lam T.T.Y., Cao W.C. // EBioMedicine – 2019. – V. 43 – P.317–324.

152. Jones L.D. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host / Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M., Nuttall P.A. // Science – 1987. – V. 237 – № 4816 – P.775–777.

153. Kahl O. Seasonal life cycle organisation of the ixodid tick *Dermacentor reticulatus* in Central Europe implications on its vector role and distribution / Kahl O., Dautel H. // *Medicine in Kuzbass* – 2013. – V. 12 – № 2 – P.84–87.
154. Karbowski G. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 1. The general pattern. / Karbowski G., Biernat B., Szewczyk T., Sytykiewicz H. // *Annals of parasitology* – 2015. – V. 61 – № 4 – P.221–228.
155. Karbowski G. The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions / Karbowski G., Biernat B., Werszko J., Rychlik L. // *Acta Parasitologica* – 2016. – V. 61 – № 1 – P.201–203.
156. Katargina O. Detection and characterization of tick-borne encephalitis virus in Baltic countries and Eastern Poland / Katargina O., Russakova S., Geller J., Kondrusik M., Zajkowska J., Zygutienė M., Bormane A., Trofimova J., Golovljova I. // *PLoS ONE* – 2013. – V. 8 – № 5.
157. Kholodilov I. Ixodid ticks and tick-borne encephalitis virus prevalence in the South Asian part of Russia (Republic of Tuva) / Kholodilov I., Belova O., Burenkova L., Korotkov Y., Romanova L., Morozova L., Kudriavtsev V., Gmyl L., Belyaetdinova I., Chumakov A., Chumakova N., Dargyn O., Galatsevich N., Gmyl A., Mikhailov M., Oorzhak N., Polienko A., Saryglar A., Volok V., Yakovlev A., Karganova G. // *Ticks and Tick-borne Diseases* – 2019. – V. 10 – № 5 – P.959–969.
158. Kholodilov I.S. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia / Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., Litov A.G., Ivannikova A.Y., Makenov M.T., Shchetinin A.M., Aibulatov S. V., Bazarova G.K., Bell-Sakyi L., Bespyatova L.A., Bugmyrin S. V., Chernetsov N., Chernokhaeva L.L., Gmyl L. V., Khaisarova A.N., Khalin A. V., Klimentov A.S., Kovalchuk I. V., Luchinina S. V., Medvedev S.G., Nafeev A.A., Oorzhak N.D., Panjukova E. V., Polienko A.E., Purmak K.A., Romanenko E.N., Rozhdestvenskiy E.N., Saryglar A.A., Shamsutdinov A.F., Solomashchenko N.I., Trifonov V.A., Volchev E.G., Vovkotech P.G., Yakovlev A.S., Zhurenkova O.B., Gushchin V.A., Karan L.S., Karganova G.G. // *Viruses* – 2021. – V. 13 – № 3 – CP.458.
159. Kholodilov I.S. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia / Kholodilov

I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., Shchetinin A.M., Ivannikova A.Y., Bell-Sakyi L., Yakovlev A.S., Bugmyrin S. V., Bespyatova L.A., Gmyl L. V., Luchinina S. V., Gmyl A.P., Gushchin V.A., Karganova G.G. // *Viruses* – 2020. – V. 12 – № 4.

160. Ko S. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea / Ko S., Kang J.G., Kim S.Y., Kim H.C., Klein T.A., Chong S.T., Sames W.J., Yun S.M., Ju Y.R., Chae J.S. // *Journal of Veterinary Science* – 2010. – V. 11 – № 3 – P.197–203.

161. Kopecký J. A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting / Kopecký J., Grubhoffer L., Kovář V., Jindrák L., Vokurková D. // *Intervirology* – 1999. – V. 42 – № 1 – P.9–16.

162. Korboukh V.K. RNA Virus population diversity: An optimum for maximal fitness and virulence / Korboukh V.K., Lee C.A., Acevedo A., Vignuzzi M., Xiao Y., Arnold J.J., Hemperly S., Graci J.D., August A., Andino R., Cameron C.E. // *Journal of Biological Chemistry* – 2014. – V. 289 – № 43 – P.29531–29544.

163. Korenberg E.I. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia / Korenberg E.I., Kovalevskii Y. V. // *Zentralblatt für Bakteriologie* – 1999. – V. 289 – № 5–7 – P.525–539.

164. Korotkov Y. Observations on changes in abundance of questing *Ixodes ricinus*, castor bean tick, over a 35-year period in the eastern part of its range (Russia, Tula region) / Korotkov Y., Kozlova T., Kozlovskaya L. // *Medical and Veterinary Entomology* – 2015. – V. 29 – № 2 – P.129–136.

165. Kovalenko A.I. Natural foci infections in Republic of Karelia / Kovalenko A.I., Rubis L.V., Ekimova O.V., Koloda N. // *EpiNorth Journal* – 2003. – V. 1.

166. Kovalev S.Y. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries / Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. // *Journal of General Virology* – 2009. – V. 90 – № 12 – P.2884–2892.

167. Kozlovskaya L.I. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus / Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.I., Rogova Y. V., Dzhivanian T.I.,

Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. // *Virology* – 2010. – V. 398 – № 2 – P.262–272.

168. Kuhn R.J. Structure of Dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion / Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S., Strauss J.H. // *Selected Papers of Michael G Rossmann with Commentaries* – 2014. – V. 108 – № 5 – P.317–325.

169. Kuivanen S. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland , / Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., Zakham F. // *Eurosurveillance* – 2019. – V. 24 – № 27 – P.pii=1900394.

170. Laaksonen M. Tick-borne pathogens in Finland: Comparison of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* in sympatric and parapatric areas / Laaksonen M., Klemola T., Feuth E., Sormunen J.J., Puisto A., Mäkelä S., Penttinen R., Ruohomäki K., Hänninen J., Sääksjärvi I.E., Vuorinen I., Sprong H., Hytönen J., Vesterinen E.J. // *Parasites and Vectors* – 2018. – V. 11 – № 1 – P.1–13.

171. Ladner J.T. A Multicomponent animal virus isolated from mosquitoes / Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P., Lindquist M.E., Sibley S.D., Kota K.P., Fetterer D., Eastwood G., Kimmel D., Prieto K., Guzman H., Aliota M.T., Reyes D., Brueggemann E.E., John L. St., Hyeroba D., Lauck M., Friedrich T.C., O'Connor D.H., Gestole M.C., Cazares L.H., Popov V.L., Castro-Llanos F., Kochel T.J., Kenny T., White B., Ward M.D., Loaiza J.R., Goldberg T.L., Weaver S.C., Kramer L.D., Tesh R.B., Palacios G. // *Cell Host and Microbe* – 2016. – V. 20 – № 3 – P.357–367.

172. Lee E. Mutagenesis of the signal sequence of Yellow Fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage in vitro is lethal for virus production / Lee E., Stocks C.E., Amberg S.M., Rice C.M., Lobigs M. // *Journal of Virology* – 2000. – V. 74 – № 1 – P.24–32.

173. Leonova G.N. Louping ill virus (LIV) in the Far East / Leonova G.N., Kondratov I.G., Maystrovskaya O.S., Takashima I., Belikov S.I. // *Archives of Virology* – 2015. – V. 160 – № 3 – P.663–673.

174. Leonova G.N. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia. / Leonova G.N., Kondratov I.G., Ternovoi V. a, Romanova E. V, Protopopova E. V, Chausov E. V,

Pavlenko E. V, Ryabchikova E.I., Belikov S.I., Loktev V.B. // Archives of virology – 2009. – V. 154 – № 5 – P.811–20.

175. Ličková M. *Dermacentor reticulatus* is a vector of tick-borne encephalitis virus / Ličková M., Fumačová Havlíková S., Sláviková M., Slovák M., Drexler J.F., Klempa B. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2020. – V. 11 – № 4.

176. Lin C. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. / Lin C., Amberg S.M., Chambers T.J., Rice C.M. // Journal of Virology – 1993. – V. 67 – № 4 – P.2327–2335.

177. Lindblom P. Tick-borne encephalitis virus in ticks detached from humans and follow-up of serological and clinical response / Lindblom P., Wilhelmsson P., Fryland L., Sjöwall J., Haglund M., Matussek A., Ernerudh J., Vene S., Nyman D., Andreassen Å., Forsberg P., Lindgren P.E. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2014. – V. 5 – № 1 – P.21–28.

178. Lindenbach B.D. Flaviviridae: The viruses and their replication / Ed. D.M. Knipe, P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. – P.1101–1151.

179. Lo C.C. Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs / Lo C.C., Chain P.S.G. // BMC Bioinformatics – 2014. – V. 15 – № 1 – P.1–8.

180. MacKenzie J.M. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A / MacKenzie J.M., Khromykh A.A., Jones M.K., Westaway E.G. // Virology – 1998. – V. 245 – № 2 – P.203–215.

181. Maldov D.G. Tick-borne encephalitis virus interaction with the target cells / Maldov D.G., Karganova G.G., Timofeev A. V. // Archives of Virology – 1992. – V. 127 – № 1–4 – P.321–325.

182. Malkhazova S. Emerging natural focal infectious diseases in Russia: A medical–geographical study / Malkhazova S., Pestina P., Prasolova A., Orlov D. // International Journal of Environmental Research and Public Health – 2020. – V. 17 – № 21 – P.1–12.

183. Mansfield K.L. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis / Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. // Journal of General Virology – 2009. – V. 90 – P.1781–1794.

184. Mansfield K.L. Identification and characterization of a novel tick-borne flavivirus subtype in goats (*Capra hircus*) in Spain / Mansfield K.L., Morales A.B., Johnson N., Ayllón N., Höfle U., Alberdi P., Fernández de Mera I.G., Marín J.F.G., Gortázar C., la Fuente J. de, Fooks A.R. // *Journal of General Virology* – 2015. – V. 96 – № 7 – P.1676–1681.
185. Maruyama S.R. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil / Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M.C., Gardinassi L.G., Garcia G.R., Brandão L.G., Rodrigues A.R., Okada M.I., Abrão E.P., Ferreira B.R., Fonseca B.A.L. da, Miranda-Santos I.K.F. de // *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* – 2014. – V. 109 – № 1 – P.38–50.
186. McLean D.M. Powassan virus: Summer infection cycle, 1964 / McLean D.M., Best J.M., Mahalingam S., Bact D., Chernesky M.A., Ewan Wilson W. // *Canadian Medical Association Journal* – 1964. – V. 91 – P.1360–1362.
187. McLean D.M. Powassan virus: isolation of virus from a fatal case of encephalitis / McLean D.M., Donohue W.L. // *Canadian Medical Association journal* – 1959. – T. 80 – № 9 – C.708–711.
188. Medlock J.M. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe / Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdakova M., Estrada-Peña A., George J.C., Golovljova I., Jaenson T.G.T., Jensen J.K., Jensen P.M., Kazimirova M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Bortel W. Van // *Parasites and Vectors* – 2013. – T. 6 – № 1 – C.1–11.
189. Melnick J.L. Isolation from human sera in egypt of a virus apparently identical to West Nile virus / Melnick J.L., Paul J.R., Riordan J.T., Barnett V.H., Goldblum N., Zabin E. // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* – 1951. – T. 77 – № 4 – C.661–665.
190. Mi X. Virus isoelectric point determination using single-particle chemical force microscopy / Mi X., Bromley E., Joshi P.U., Long F., Heldt C.L. // *Langmuir* – 2019.
191. Mikryukova T.P. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia) / Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y. V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyuten'kov O.Y., Protopopova E. V., Romanenko

- V.N., Chausov E. V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2014. – T. 5 – № 2 – C.145–151.
192. Morozova O. V. Quantitations of *Borrelia* and *Bartonella* DNA and tick-borne encephalitis virus RNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Chelyabinsk region / Morozova O. V., Grishechkin A.E., Konkova-Reidman A.B. // Molecular Genetics, Microbiology and Virology – 2011. – T. 26 – № 1 – C.41–45.
193. Moskvitina N.S. The role of birds in the maintenance of tick borne infections in the Tomsk anthropurgic foci / Moskvitina N.S., Korobitsyn I.G., Gashkov S.I., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., Mikryukova T.P., Protopopova E. V, Chausov E. V, Konovalova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. // Biology Bulletin – 2014. – T. 41 – № 4 – C.408–414.
194. Mukhopadhyay S. Structure of West Nile virus / Mukhopadhyay S., Kim B.S., Chipman P.R., Rossmann M.G., Kuhn R.J. // Science – 2003. – T. 302 – № 5643 – C.248.
195. Muller D.A. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis / Muller D.A., Landsberg M.J., Bletchly C., Rothnagel R., Waddington L., Hankamer B., Young P.R. // Journal of General Virology – 2012. – T. 93 – № 4 – C.771–779.
196. Murgue B. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000 / Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G. // Annals of the New York Academy of Sciences – 2001. – T. 951 – № 0 – C.117–126.
197. Musso D. Potential sexual transmission of Zika virus / Musso D., Roche C., Robin E., Nhan T., Teissier A. // Emerging Infectious Diseases – 2015. – T. 21 – № 2 – C.2013–2015.
198. Nikitin N. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size / Nikitin N., Trifonova E., Evtushenko E., Kirpichnikov M., Atabekov J., Karpova O. // PLoS ONE – 2015. – T. 10 – № 11 – C.1–11.
199. Nosek J. Replication of tick-borne encephalitis (TBE) virus in ticks *Dermacentor marginatus* / Nosek J., Kozuch O. // Angewandte Parasitologie – 1985. – T. 26 – № 2 – C.97–101.

200. Nur Y.A. An outbreak of West Nile fever among migrants in Kisangani, Democratic Republic of Congo / Nur Y.A., Groen J., Heuvelmans H., Tuynman W., Copra C., Osterhaus A.D.M.E. // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* – 1999. – T. 61 – № 6 – C.885–888.
201. Pascoal J. de O. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil / Pascoal J. de O., Siqueira S.M. de, Maia R. da C., Juan Szabó M.P., Yokosawa J. // *Ticks and Tick-borne Diseases* – 2019. – T. 10 – № 1 – C.162–165.
202. Pavlidou V. Genetic study of the distribution of greek goat encephalitis virus in Greece / Pavlidou V., Gerou S., Diza E., Antoniadis A., Papa A. // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* – 2008. – T. 8 – № 3 – C.351–354.
203. Platonov A.E. West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: Were we ready? Are we ready? / Platonov A.E. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2001. – T. 951 – C.102–116.
204. Preziuso S. Detection of Japanese encephalitis virus in bone marrow of healthy young wild birds collected in 1997–2000 in Central Italy / Preziuso S., Mari S., Mariotti F., Rossi G. // *Zoonoses and Public Health* – 2018. – T. 65 – № 7 – C.798–804.
205. Qin X.-C. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors / Qin X.-C., Shi M., Tian J.-H., Lin X.-D., Gao D.-Y., He J.-R., Wang J.-B., Li C.-X., Kang Y.-J., Yu B., Zhou D.-J., Xu J., Plyusnin A., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2014. – T. 111 – № 18 – C.6744–6749.
206. Rappleye W.C. *Epidemiology of Japanese B encephalitis*. New York: Columbia University Press, 1939. – 157c.
207. Rar V. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia / Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. // *Parasites & Vectors* – 2017. – T. 10 – № 1 – C.258.
208. Rizzoli A. The challenge of west nile virus in Europe: Knowledge gaps and research

priorities / Rizzoli A., Jiménez-Clavero M.A., Barzon L., Cordioli P., Figuerola J., Koraka P., Martina B., Moreno A., Nowotny N., Pardigon N., Sanders N., Ulbert S., Tenorio A. // *Eurosurveillance* – 2015. – T. 20 – № 20 – C.21135.

209. Rodenhuis-Zybert I.A. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity / Rodenhuis-Zybert I.A., Wilschut J., Smit J.M. // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2010. – T. 67 – № 16 – C.2773–2786.

210. Romanova L.I. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation / Romanova L.I., Gmyl A.P., Dzhivanian T.I., Bakhmutov D. V., Lukashev A.N., Gmyl L. V., Rumyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. // *Virology* – 2007. – T. 362 – C.75–84.

211. Rubel F. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe / Rubel F., Brugger K., Pfeffer M., Chitimia-Dobler L., Didyk Y.M., Leverenz S., Dautel H., Kahl O. // *Ticks and Tick-borne Diseases* – 2016. – T. 7 – № 1 – C.224–233.

212. Růžek, D. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines / Ruzek D., Avšič Županc T., Borde J., Chrdle A., Eyer L., Karganova G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., Matveev A., Miller A.D., Osolodkin D.I., Överby A.K., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. // *Antiviral Research* – 2019. – T. 164 – C.33–51.

213. Růžek D. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR / Růžek D., Šťastná H., Kopecký J., Golovljova I., Grubhoffer L. // *Journal of Virological Methods* – 2007. – T. 144 – № 1–2 – C.133–137.

214. Růžek D. Omsk haemorrhagic fever / Růžek D., Yakimenko V. V., Karan L.S., Tkachev S.E. // *The Lancet* – 2010. – T. 376 – № 9758 – C.2104–2113.

215. Sameroff S. Viral Diversity of Tick Species Parasitizing Cattle and Dogs in Trinidad and Tobago / Sameroff S., Tokarz R., Charles R.A., Jain K., Oleynik A., Che X., Georges K., Carrington C. V., Lipkin W.I., Oura C. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C.1–10.

216. Scaramozzino N. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses

targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences / Scaramozzino N., Crance J.-M., Jouan A., DeBriel D.A., Stoll F., Garin D. // Journal of Clinical Microbiology – 2001. – T. 39 – № 5 – C.1922–1927.

217. Shchuchinova L.D. Influence of altitude on tick-borne encephalitis infection risk in the natural foci of the Altai Republic, Southern Siberia / Shchuchinova L.D., Kozlova I.V., Zlobin V.I. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2015. – T. 6 – № 3 – C.322–329.

218. Shi M. Divergent viruses discovered in arthropods and vertebrates revise the evolutionary history of the flaviviridae and related viruses. / Shi M., Lin X.-D., Vasilakis N., Tian J.-H., Li C.-X., Chen L.-J., Eastwood G., Diao X.-N., Chen M.-H., Chen X., Qin X.-C., Widen S.G., Wood T.G., Tesh R.B., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. // Journal of virology – 2016. – T. 90 – № 2 – C.659–69.

219. Simmonds P. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae / Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T. // Journal of General Virology – 2017. – T. 98 – № 1 – C.2–3.

220. Smithburn K.C. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda / Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H. // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene – 1940. – T. 20 – № 4 – C.471–492.

221. Soleng A. Distribution of *Ixodes ricinus* ticks and prevalence of tick-borne encephalitis virus among questing ticks in the Arctic Circle region of northern Norway / Soleng A., Edgar K.S., Paulsen K.M., Pedersen B.N., Okbaldet Y.B., Skjetne I.E.B., Gurung D., Vikse R., Andreassen Å.K. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2018. – T. 9 – № 1 – C.97–103.

222. de Souza W.M. Viral diversity of *Rhipicephalus microplus* parasitizing cattle in southern Brazil / Souza W.M. de, Fumagalli M.J., Torres Carrasco A. de O., Romeiro M.F., Modha S., Seki M.C., Gheller J.M., Daffre S., Nunes M.R.T., Murcia P.R., Acrani G.O., Figueiredo L.T.M. // Scientific Reports – 2018. – T. 8 – № 1 – C.1–10.

223. Speight G. Gene mapping and positive identification of the non-structural proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4B and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavage sites / Speight G., Coia G., Parker M.D., Westaway E.G. // Journal of General Virology – 1988. – T. 69 – № 1 – C.23–34.

224. Stadler K. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. / Stadler K., Allison S.L., Schalich J., Heinz F.X. // Journal of virology – 1997. – T. 71 – № 11 – C.8475–8481.
225. Stiasny K. Differences in the postfusion conformations of full-length and truncated class II fusion protein E of tick-borne encephalitis virus / Stiasny K., Kössl C., Heinz F.X. // Journal of Virology – 2005. – T. 79 – № 10 – C.6511–6515.
226. Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia - An overview / Süss J. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2011. – T. 2 – № 1 – C.2–15.
227. Ta M. Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus / Ta M., Vрати S. // Journal of Virology – 2000. – T. 74 – № 11 – C.5108–5115.
228. Takeda T. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan / Takeda T., Ito T., Chiba M., Takahashi K., Niioka T., Takashima I. // Journal of Medical Entomology – 1998. – T. 35 – № 3 – C.227–231.
229. Telford III S.R. A new tick-borne encephalitis-like virus infecting new england deer ticks, *Ixodes dammini* / Telford III S.R., Armstrong P.M., Katavolos P., Foppa I., Garcia A.S., Wilson M.L., Spielman A. // Emerging Infectious Diseases – 1997. – T. 3 – № 2 – C.165–170.
230. Temmam S. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses / Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., Dufou E., Petres S., Devillers E., Hoem T., Pinarello V., Hul V., Vongphayloth K., Hertz J.C., Loiseau I., Dumarest M., Duong V., Vayssier-Taussat M., Grandadam M., Albina E., Dussart P., Moutailler S., Cappelle J., Brey P.T., Eloit M. // mSphere – 2019. – T. 4 – № 6 – C.1–13.
231. Tetteh K.K.A. Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy / Tetteh K.K.A., Loukas A., Tripp C., Maizels R.M. // Infection and Immunity – 1999. – T. 67 – № 9 – C.4771–4779.
232. Thomas L.A. Isolation of a virus closely related to Powassan virus from *Dermacentor andersoni* collected along North Cache la Poudre River, Colo / Thomas L.A., Kennedy R.C.,

Eklund C.M. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine – 1960. – T. 104 – № 2 – C.355–359.

233. Tkachev S.E. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus / Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., Lisak O.V., Doroshchenko E.K., Dzhioev Y.P., Suntsova O.V., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Savinova Y.S., Paramonov A.I., Glupov V.V., Zlobin V.I., Tikunova N.V. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2020. – T. 11 – № 2 – C.101327.

234. Tokarevich N. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: The case of the Komi Republic / Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. // International Journal of Circumpolar Health – 2017. – T. 76 – № 1 – C.1–13.

235. Vandegrift K.J. Presence of segmented flavivirus infections in North America / Vandegrift K.J., Kumar A., Sharma H., Murthy S., Kramer L.D., Ostfeld R., Hudson P.J., Kapoor A. // Emerging Infectious Diseases – 2020. – T. 26 – № 8 – C.1810–1817.

236. Venugopal K. Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of negishi virus shows very close homology to louping ill virus / Venugopal K., Buckley A., Reid H.W., Gould E.A. // Virology – 1992. – T. 190 – № 1 – C.515–521.

237. Villa E.C. Complete coding genome sequence for Mogiana tick virus, a Jingmenvirus isolated from ticks in Brazil / Villa E.C., Maruyama S.R., Miranda-Santos I.K.F. de, Palacios G., Ladner J.T. // Genome Announcements – 2017. – T. 5 – № 18 – C.17–18.

238. Wang Z.-D. A new segmented virus associated with human febrile illness in China / Wang Z.-D., Wang B., Wei F., Han S.-Z., Zhang L., Yang Z.-T., Yan Y., Lv X.-L., Li L., Wang S.-C., Song M.-X., Zhang H.-J., Huang S.-J., Chen J., Huang F.-Q., Li S., Liu H.-H., Hong J., Jin Y.-L., Wang W., Zhou J.-Y., Liu Q. // New England Journal of Medicine – 2019a. – T. 380 – № 22 – C.2116–2125.

239. Wang Z.-D. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia , northeastern China / Wang Z.-D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., Liu Q. // Parasites & Vectors – 2019b. – T. 12 – № 1 – C.1–7.

240. Webster C.L. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with

- Drosophila melanogaster* / Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S., Crowson D., Ferrari G., Quintana J.F., Brouqui J.M., Bayne E.H., Longdon B., Buck A.H., Lazzaro B.P., Akorli J., Haddrill P.R., Obbard D.J. // PLoS Biology – 2015. – T. 13 – № 7 – C.1–33.
241. Weinberger M. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects / Weinberger M., Pitlik S.D., Gandacu D., Lang R., Nassar F., David D. Ben, Rubinstein E., Izthaki A., Mishal J., Kitzes R., Siegman-Igra Y., Giladi M., Pick N., Mendelson E., Bin H., Shohat T. // Emerging Infectious Diseases – 2001. – T. 7 – № 4 – C.686–691.
242. Whitney E. The first isolation of Powassan virus in New York state / Whitney E., Jamnback H. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine – 1961. – T. 1 – № 9 – C.432–435.
243. Wikan N. Zika virus: History of a newly emerging arbovirus / Wikan N., Smith D.R. // The Lancet Infectious Diseases – 2016. – T. 16 – № 7 – C.e119–e126.
244. Wójcik-Fatla A. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland) / Wójcik-Fatla A., Cisak E., Zajac V., Zwoliński J., Dutkiewicz J. // Ticks and Tick-borne Diseases – 2011. – T. 2 – № 1 – C.16–19.
245. Ytrehus B. Tick-borne encephalitis virus and Louping ill virus may co-circulate in Southern Norway / Ytrehus B., Vainio K., Dudman S.G., Gilray J., Willoughby K. // Vector-Borne and Zoonotic Diseases – 2013. – T. 13 – № 10 – C.762–768.
246. Yudin N.S. Human genetic predisposition to diseases caused by the viruses of *Flaviviridae* family / Yudin N.S., Barkhash A.V., Maksimov V.N., Ignatieva E.V., Romaschenko A.G. // Molekulyarnaya biologiya – 2018. – T. 52 – № 2 – C.190–209.
247. Yun S.M. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks collected from the Republic of Korea during 2011-2012 / Yun S.M., Song B.G., Choi W.Y., Park W. Il, Kim S.Y., Roh J.Y., Ryou J., Ju Y.R., Park C., Shin E.H. // Osong Public Health and Research Perspectives – 2012. – T. 3 – № 4 – C.213–221.
248. Zhang G. A dataset of distribution and diversity of ticks in China / Zhang G., Zheng D., Tian Y., Li S. // Scientific Data – 2019. – T. 6 – № 1 – C.1–7.
249. Zhang X. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence /

Zhang X., Wang N., Wang Z., Liu Q. // Current Opinion in Virology – 2020. – T. 40 – C.11–18.