

Холодилов Иван Сергеевич

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

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Карганова Галина Григорьевна

Официальные оппоненты:

Ларичев Виктор Филиппович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кюрегян Карен Каренович – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом изучения вирусных гепатитов. Научно-исследовательский институт молекулярной и персонализированной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Колясникова Надежда Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, изменять вирулентность для человека и использовать альтернативные пути передачи.

В настоящее время на территории России отмечена циркуляция флавивирусов переносимых как комарами (вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита и вирус Ламми), так и клещами (вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ), вирус Повассан, вирус шотландского энцефаломиелита овец (ШЭО)).

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.

ВКЭ детектируют в более 20 видах клещей, но основными переносчиками считаются клещи *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*, чей ареал в последнее время постоянно расширяется. Так клещи *I. persulcatus* были найдены около Полярного круга, а клещи *I. ricinus* – за Полярным кругом. Вместе с расширением ареала основных векторов произошло и расширение ареала ВКЭ. Вирус был обнаружен в Скандинавских странах, 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, обитающие в клещах.

В Китае были выделены флавиподобные вирусы, которые отличаются от классических флавивирусов принципиально другим строением генома и представляют обособленную группу в семействе *Flaviviridae*. Имеются данные о возможной патогенности этих вирусов для

человека. 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 ограничено. 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.

Задачи исследования:

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, и показано его широкое распространение в клещах на территории России.
3. Выявлен и изолирован штамм сегментированного флавиподобного вируса Янггоу из клещей, собранных 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 Янггоу длительно персистировать в культурах клеток клещей *Hyalomma anatolicum* (НАЕ/СТVM8) и *I. ricinus* (IRE/СТVM19), не вызывая цитопатического эффекта.
7. Получена информация о морфологии вирионов вируса Алонгшан.

Теоретическая значимость работы

Получена новая информация об особенностях распространения и эволюции популяции ВКЭ на границах его ареала. Впервые выявлена циркуляция флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу 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.

Практическая значимость работы

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 последовательность генома 21 штамма/ампликона ВКЭ, 38 штаммов/ампликонов вируса Алонгшан и 1 штамма вируса Янггоу.

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.

Личный вклад автора

Личное участие автора в получении научных результатов диссертации заключалась в проведении анализа литературы, изучении степени разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных в результате работы данных, подготовке к печати публикаций и написании диссертации. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 1.5.10 – «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований, пунктам №2, 3, 8, 10 паспорта специальности.

Апробация работы

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).

Объем и структура 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Сравнение методов выявления вируса клещевого энцефалита в биологических материалах

В 2010-х годах самым распространенным в России методом исследования клещей на наличие ВКЭ являлся ИФА. Доля исследований с использованием ПЦР составляла 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. Попытки выявления вируса в этих материалах с помощью вирусологических и молекулярных методов не были результативными. 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, и с

большим количеством клещей из природы показали, что метод ПЦР более чувствителен и специфичен, чем ИФА. Тем не менее, требовалось экспериментальное объяснение причин возникновения ложноположительных реакций.

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. В работе были использованы коммерческие тест-системы на основе ИФА и ПЦР-РВ. Кроме того мы исследовали вирусы в ПЦР с использованием праймеров на фрагмент генома, кодирующий белок NS5 флавивирусов (панфлави).

Все вирусы, использованные в работе, показали положительный результат при использовании коммерческой тест-системы на основе ИФА, но в различных концентрациях (Таблица 1).

При исследовании вирусов с помощью коммерческой тест-системы на основе ПЦР-РВ три штамма ВКЭ 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 1). ПЦР-РВ является более специфичным методом, однако, и он давал положительную реакцию с филогенетически наиболее близким к ВКЭ вирусом ШЭО. 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 1 – Оценка специфичности различных методов выявления ВКЭ с использованием представителей рода *Flavivirus*

Вирус	Минимально выявляемые концентрации вируса, IgБОЕ/мл		
	ИФА ¹	ПЦР-РВ	ПЦР ²
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 IgБОЕ/мл)	6,3	не выявили	2,3
вирус Лангат – штамм ТР-21 (максимальная концентрация 8,7 IgБОЕ/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;

² полимеразная цепная реакция проводилась с использованием праймеров на участок генома, кодирующего фрагмент белка NS5 флавивирусов (панфлави) – cFD2-MAMD

Для оценки возможных ложноположительных реакций были исследованы 205 иксодид разных видов, собранных в Московской области и республике Татарстан и разделенных на пулы по 1-7 особи (всего 83 пробы). 64 пробы клещей гомогенизировали в среде 199 на растворе Эрла, а потом добавляли раствор для разведения исследуемых образцов 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 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 панфлави праймеров и 25 пулов на наличие ВКЭ с использованием праймеров Kgg19 и Kgg31, обеспечивающих более высокую чувствительность по сравнению с панфлави праймерами, 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).

Из положительных в ИФА пулов была получена чистая культура 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 коммерческой тест-системы на основе ИФА на наличие антигена ВКЭ.

Из 15 исследованных изолятов микроорганизмов 4 изолята, представлявшие виды *Pseudomonas luteola*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus weihenstephanensis*, оказались положительными в ИФА на наличие антигена ВКЭ. 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.

Таким образом, возможными причинами появления ложноположительных реакций в ИФА могут являться:

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

2. Выявление и изоляция флавивирусов и флавиподобных вирусов на различных территориях России

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 1), в основе которой лежат случаи регистрации заболевания КЭ, поскольку мы не могли опираться на данные о распространения вируса, полученные с помощью ИФА.

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.

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. Основными причинами наблюдаемых явлений считается изменение климата и антропогенный фактор.

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.



Рисунок 1 – Эндемичные по клещевому энцефалиту территории России (синий цвет). Регионы исследования (красный цвет). Карта была подготовлена на основе официальных данных Роспотребнадзора России об эндемичных по клещевому энцефалиту территориях.

Для исследования были выбраны регионы на границе ареала ВКЭ в различных зонах (Рисунок 1). 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.

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* (n=724), *I. persulcatus* (n=2756), *D. reticulatus* (n=922), *D. marginatus* (n=1175), *D. silvarum* (n=85), *D. nuttalli* (n=1027), *Hyalomma marginatum* (n=254), *H. scupense* (n=1), *Haemaphysalis concinna* (n=8), *Haem. punctata* (n=79), *Rhipicephalus rossicus* (n=84) и *R. sanguineus* (n=7) (Рисунок 2).

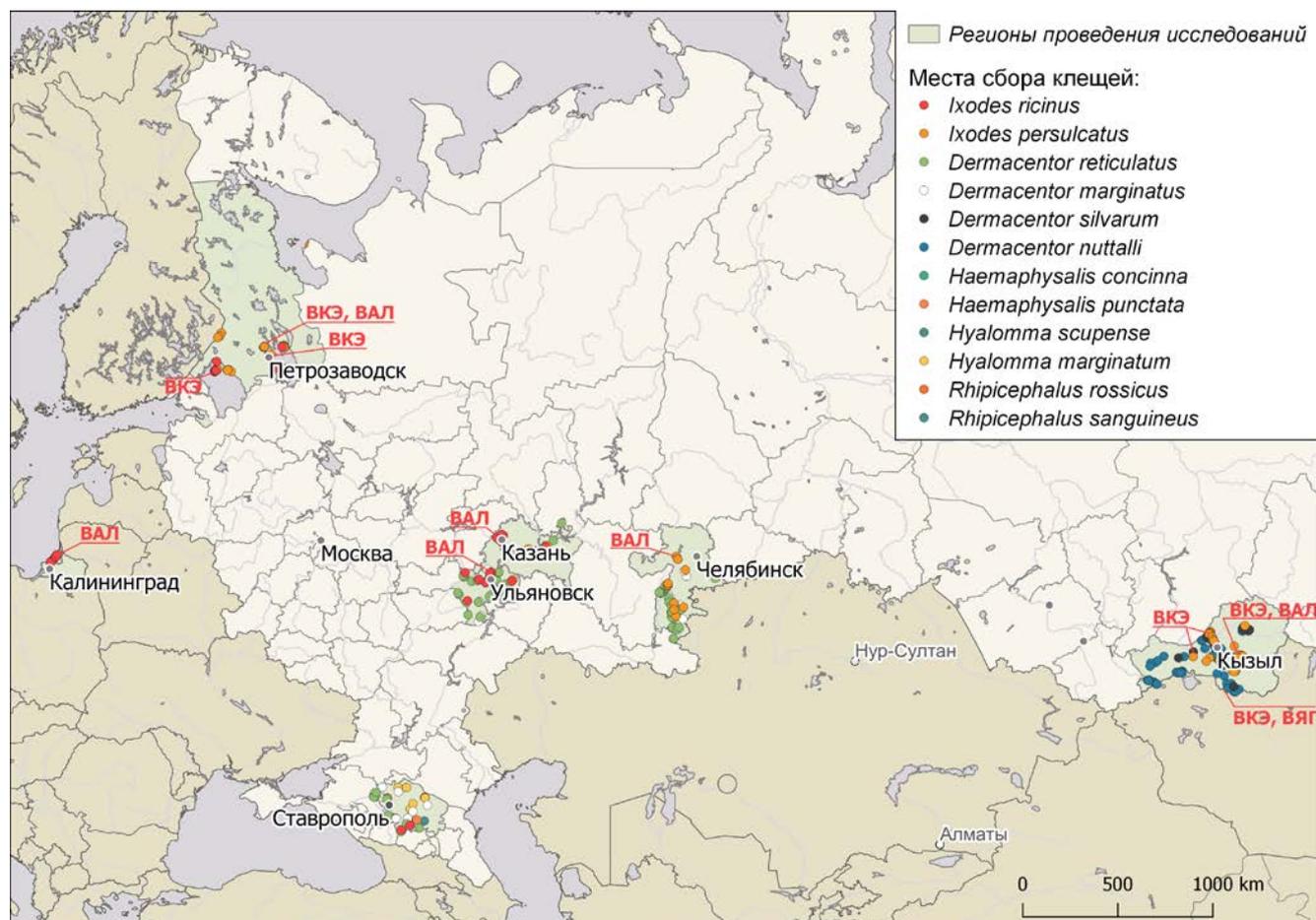


Рисунок 2 – Места сбора клещей и выявления ВКЭ, вирусов Алонгшан (ВАЛ) и Янгтоу (ВЯГ).

ВКЭ был выявлен в республиках Карелия и Тыва (Рисунок 2). В республике Карелия мы не обнаружили ВКЭ в клещах *I. ricinus*. По-видимому, вирусофорность клещей *I. ricinus* составляет менее 1%. Для клещей *I. persulcatus* вирусофорность составила 0,3 – 1,7%. 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 и Финляндии, соответственно. Штаммы ВКЭ из республики Карелия образовывали три монофилетические группы в рамках балтийской группы сибирского подтипа ВКЭ (Рисунок 3). В одну группу вошли штаммы только из республики Карелия (дер. Гомсельга и пригород Петрозаводска). Эта группа показала высокую генетическую стабильность и фактически представляет локальный очаг (расстояние между точками сбора клещей менее 30 км). Штаммы, изолированные с интервалом в 12 лет (2006 г., 2014 г. и 2018 г.), на участке генома, кодирующем фрагмент белка E (1225 нт), показали уровень дивергенции менее 0,7%. С другой стороны, в том же месте были изолированы штаммы, входящие в другие монофилетические группы, которые помимо карельских штаммов включали штаммы, изолированные из клещей с более отдаленных территорий (расстояние между точками 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. 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 птицами из Эстонии и Вологодской области.

Куршская коса также 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 из-за высокой численности клещей и возможности заноса различных вариантов вируса с других территорий.

Сбор клещей в южных регионах проводили в степных и лесостепных районах, где основным обитателем являются клещи рода *Dermacentor*, роль которых в поддержании очагов КЭ до конца не ясна, и отмечается спорадическая заболеваемость. Мы не нашли ВКЭ в клещах из Челябинской области, республики Татарстан и Ульяновской области. А также в клещах из Ставропольского края, положительных на наличие антигена ВКЭ в ИФА.

В республике Тыва зараженность клещей *I. persulcatus* колебалась от 0,9% до 4,76%. Зараженность клещей *D. silvarum* составила 8,6% и статистически не отличалась от зараженности *I. persulcatus*, как внутри одного округа, так и в общем, по республике. Зараженность клещей *D. nuttalli* составила от 5,2% до 8,3% и статистически не отличалась от таковой для *I. persulcatus* и *D. silvarum*. 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., а в клещах *I. persulcatus* – 1506 м н.у.м. Для изоляции вируса было использовано 14 ампликон содержащих суспензий клещей

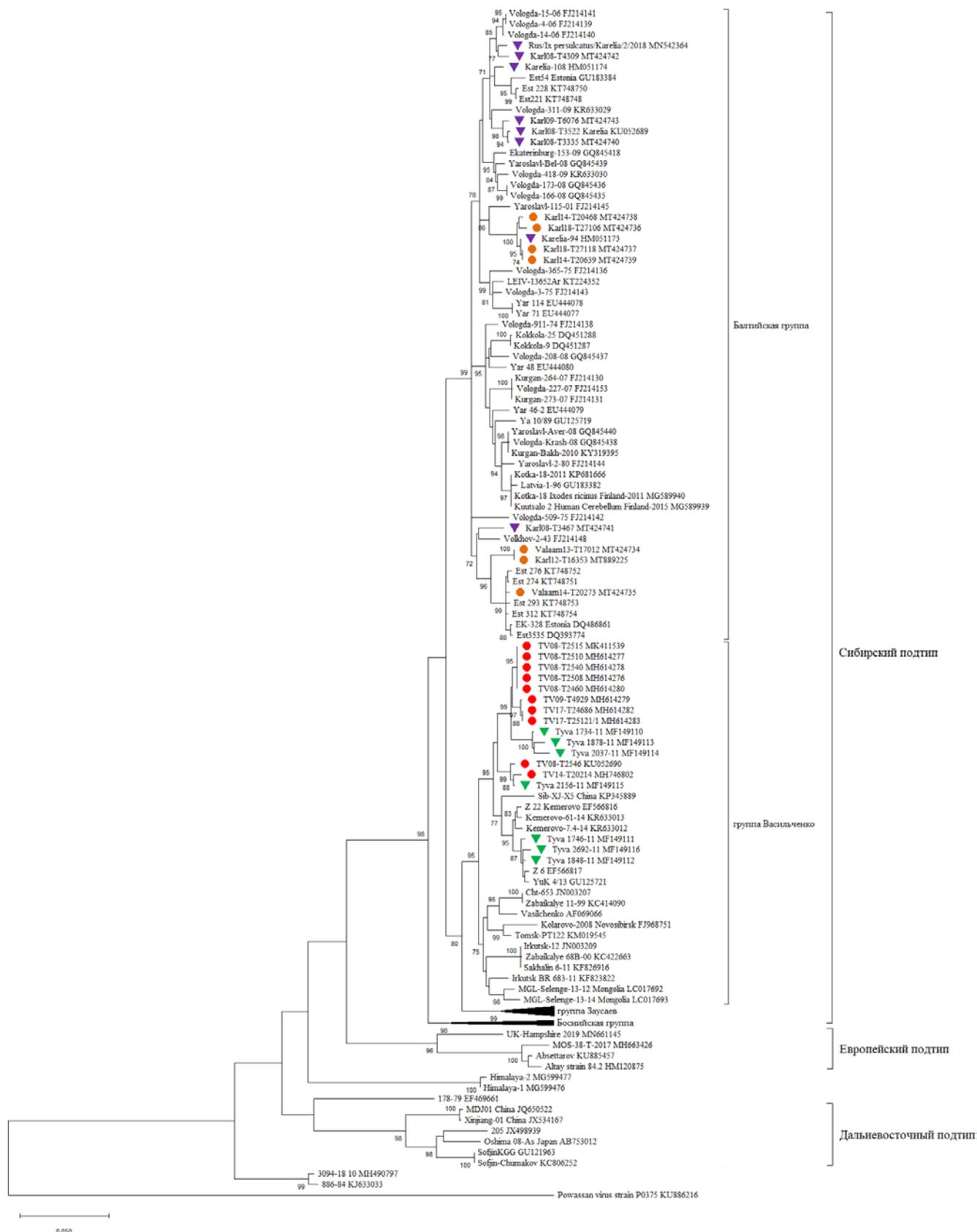


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево вируса клещевого энцефалита построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) по фрагменту генома, кодирующему белок E. Штаммы, описанные в данной работе, отмечены красными кругами (Тыва) и оранжевым кругами (Карелия). Штаммы, выделенные другими авторами – зелеными треугольниками (Тыва) и фиолетовыми треугольниками (Карелия).

I. persulcatus, и было изолировано 9 штаммов (64% изоляции). Для изоляции вирусов из клещей *D. nuttalli* было использовано 33 ампликон содержащих суспензии, и был изолирован только 1 штамм ВКЭ (3% изоляции). Все штаммы, описанные в работе, отнесены к группе Васильченко сибирского подтипа ВКЭ и совместно с 4 штаммами, выделенными в Тыве в 2011 г. сибирскими учеными, образовывали одну монофилетическую группу (Рисунок 3). Другие 3 штамма, выделенные на территории республики Тыва теми же авторами, образовывали общую группу со штаммами, выделенными в Кемеровской области и Китае, что может быть следствием заноса вируса птицами или при перевозке скота на территорию Тывы.

Таким образом, одним из наиболее важных факторов, определяющих разнообразие вариантов ВКЭ, циркулирующих на границах ареала, является занос вирусов/клещей из других регионов. Локальные очаги ВКЭ могут значительно различаться по значению этого фактора.

При исследовании тех же клещей было обнаружено 39 ампликонов вируса Алонгшан (Таблица 2, Рисунок 4). Двенадцать ампликонов были детектированы с помощью праймеров на род *Flavivirus* (панфлави) и тридцать два ампликона были детектированы с помощью специфических праймеров на сегмент 2. Вирусы были найдены практически во всех исследуемых регионах, но их распространение было неравномерным (Рисунок 2). 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). В клещах из Ставропольского края вирус Алонгшан детектирован не был. Вирус Алонгшан был детектирован в клещах *I. persulcatus* (республики Тыва и Карелия, Челябинская область), *I. ricinus* (Калининградская и Ульяновская области, республика Татарстан), *D. reticulatus* (Ульяновская область) (Таблица 2).

Наименьшая вирусофорность клещей была в республиках Тыва, Карелия и Татарстан, и составляла 0,6%, 0,8% и 1,4%, соответственно. В остальных регионах вирусофорность клещей составляла от 1,8% (Калининградская область) до 5,1% (Калининградская область).

Вирус Янггоу был выявлен только в клещах *D. nuttalli* из республики Тыва, и их зараженность составила 0,5% (Таблица 2, Рисунок 4). Штамм Erzin14-T20074 вируса Янггоу был изолирован из напитавшихся клещей *D. nuttalli*, собранных с крупного рогатого скота. Мы не можем исключить возможность того, что вирус Янггоу был получен во время питания клеща на зараженном животном, так как ранее была показана вирусемия у млекопитающих, инфицированных другими представителями группы Джингмен.

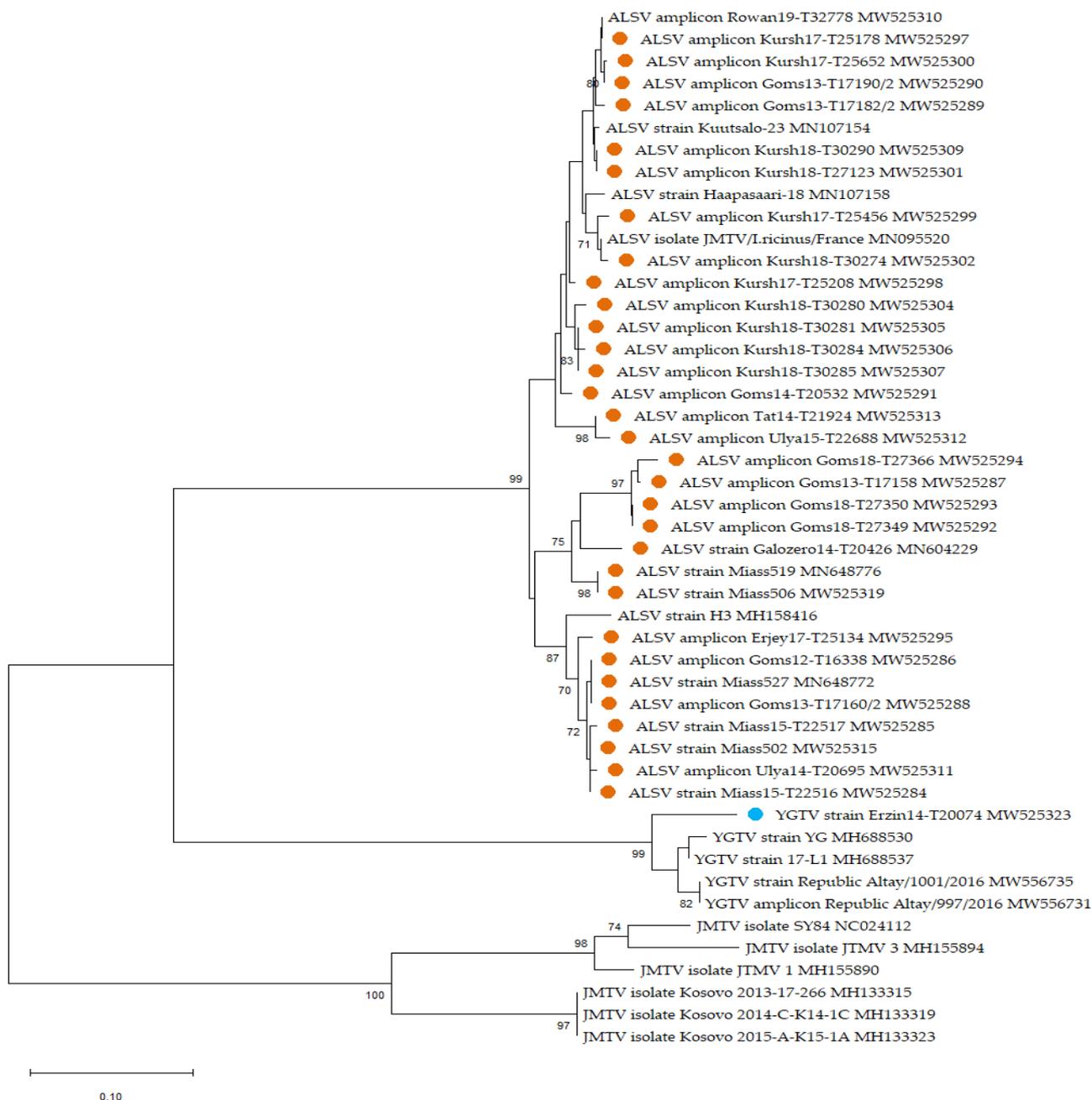


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево вирусов Алонгшан и Янггоу. Филогенетическое дерево было построено по фрагменту сегмента 2 в 233 нт с использованием метода ближайшего соседа в MEGA X. Оранжевые кружки – ампликоны/штаммы вируса Алонгшан, описанные в данном исследовании. Синий кружок – штамм вируса Янггоу, описанный в данном исследовании. YGTV = вирус Янггоу, JMTV = вирус Джингмен, ALSV = вирус Алонгшан.

Таблица 2 – Штаммы («ш») или ампликоны («а») вирусов Алонгшан и Янггоу выделенных или детектированных в клещах

Штамм («ш»)/ ампликон («а»)	Вид клеща	Год, регион (GPS)	Номер GenBank
вирус Алонгшан			
a. 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
a. Miass508	<i>I. persulcatus</i>		MT210221
a. Miass510	<i>I. persulcatus</i>		MT210225
a. Miass515	<i>I. persulcatus</i>		MT210223
ш. Miass519	<i>I. persulcatus</i>		MN648774 – MN648777
a. Miass523	<i>I. persulcatus</i>		MT210224
ш. Miass527	<i>I. persulcatus</i>		MN648770 – MN648773
ш. Miass15-T22516	<i>I. persulcatus</i>	2015, Челябинская область	MW525284
ш. Miass15-T22517	<i>I. persulcatus</i>	(55.021583°, 60.169783°)	MW525285
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	MW525287
a. Goms13-T17160/2	<i>I. persulcatus</i>	(62.069381°, 33.964528°)	MW525288
a. Goms13-T17182/2	<i>I. persulcatus</i>	2013, республика Карелия	MW525289
a. Goms13-T17190/2	<i>I. persulcatus</i>	(62.068557°, 33.962730°)	MW525290
ш. Galozero14-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	MW525292
a. Goms18-T27350	<i>I. persulcatus</i>	(62.075230°, 33.946687°)	MW525293
a. Goms18-T27366	<i>I. persulcatus</i>	2018, республика Карелия (62.067203°, 33.933651°)	MW525294
a. Erjey17-T25134	<i>I. persulcatus</i>	2017, республика Тыва (51.32646°, 95.98224°)	MW525295
a. Sizim17-T25125	<i>I. persulcatus</i>	2017, республика Тыва (51.33110°, 95.94315°)	MW525296
a. Kursh17-T25178	<i>I. ricinus</i>	2017, Калининградская область	MW525297
a. Kursh17-T25208	<i>I. ricinus</i>	(54.972030°, 20.508669°)	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
a. Ulya14-T20695	<i>D. reticulatus</i>	2014, Ульяновская область (54.446204°, 48.379524°)	MW525311

а. Ulya15-T22688	<i>I. ricinus</i>	2015, Ульяновская область (54.588423°, 48.416590°)	MW525312
а. Tat14-T21924	<i>I. ricinus</i>	2014, республика Татарстан (55.85397°, 48.7577°)	MW525313
вирус Янггоу			
ш. Erzin14-T20074	<i>D. nuttalli</i>	2014, республика Тыва (50.13304°, 95.4722°)	MW525322 – MW525325

3. Общая характеристика выявленных флавиподобных вирусов

Семь случайно выбранных проб (Miass502, Miass506, Miass519, Miass527, Miass15-T22516, Miass15-T22517, Galozero14-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. 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 ЦПД.

Сконцентрированный и очищенный в градиенте плотности сахарозы вирус был использован для электронной микроскопии, которая показала, что большинство вирионов штамма Miass527 вируса Алонгшан представляли собой сферические частицы диаметром $40,5 \pm 3,7$ нм (Рисунок 5, А, Б). У них были либо электроннопрозрачные, либо электронно-плотные ядра. Вирусные частицы с электронно-плотным ядром выглядели как пустые формы, не содержащие 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 5, В, Г). Можно предположить, что эти маленькие частицы являются 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.

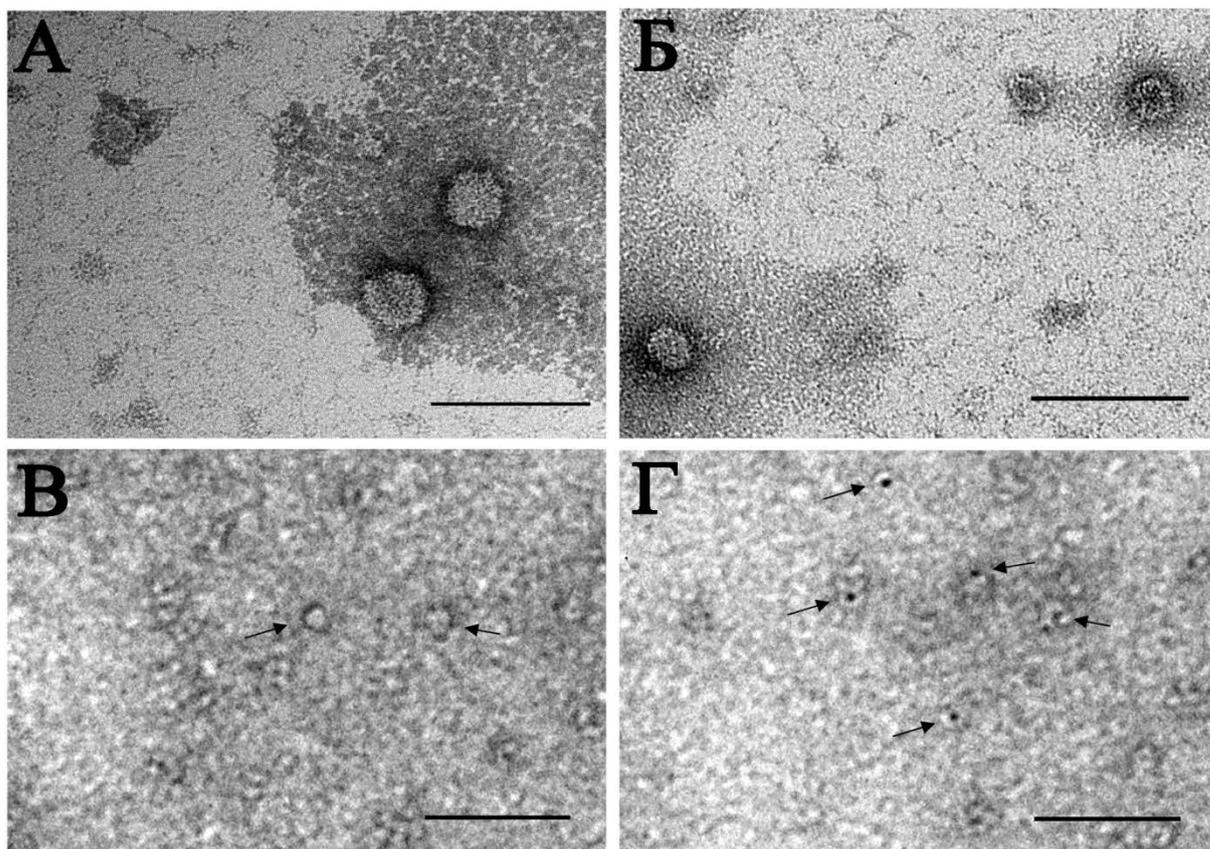


Рисунок 5 – Просвечивающая электронная микроскопия. Электронные микрофотографии очищенных вирусных частиц штамма Miass527 вируса Алонгшан, размноженного в клетках IRE/CTVM19 (А, Б). Видны мелкие частицы с электронно-полупрозрачным (В) или электронно-плотным (Г) ядром. Образцы окрашивали 2% уранилацетатом. Масштабные полосы, 100 нм.

Сегмент 2 кодирует белки VP1a, VP1b и nuORF. Так как, по-видимому, белки VP1a и VP1b являются поверхностными структурными белками, мы предположили, что эти белки могут определять круг хозяев. 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 6, А). Штаммы Galozero14-T20426 и Coms13-T17158, изолированные в республике Карелия, и штаммы Miass519 и Miass506 из Челябинской области образовывали европейскую подгруппу, а штаммы Etjeu17-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 были изолированы из клещей с территории ареала *I. persulcatus*, и европейскую группу, которая в свою очередь разделилась согласно ареалу клещей на группы «*I. persulcatus*» и «*I. ricinus*» (Рисунок 6, Б).

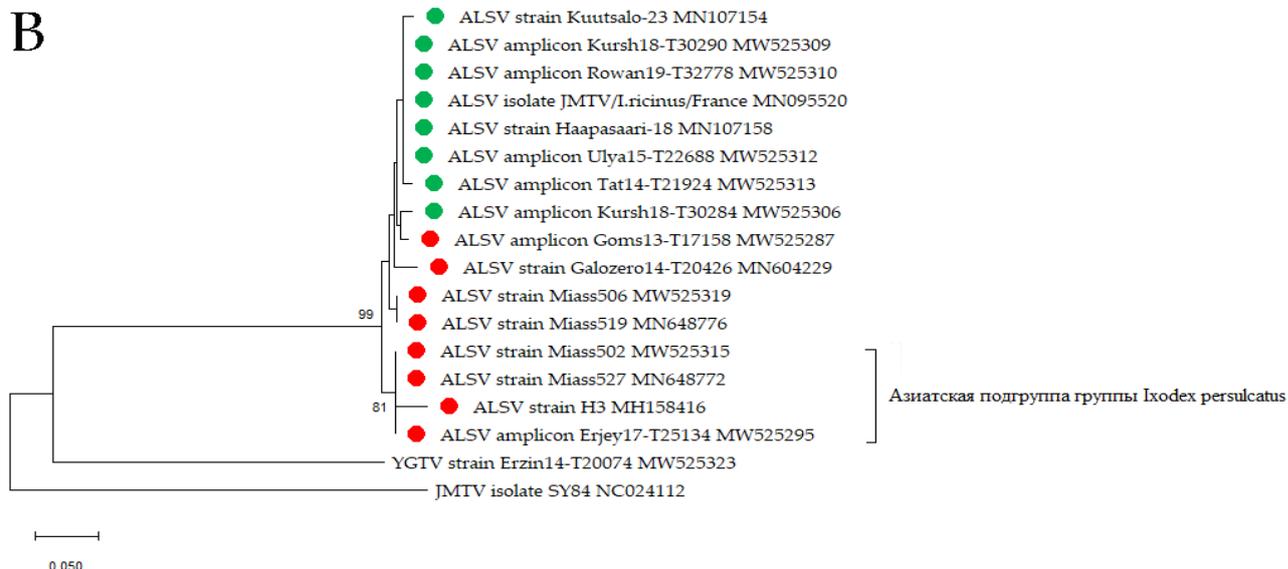
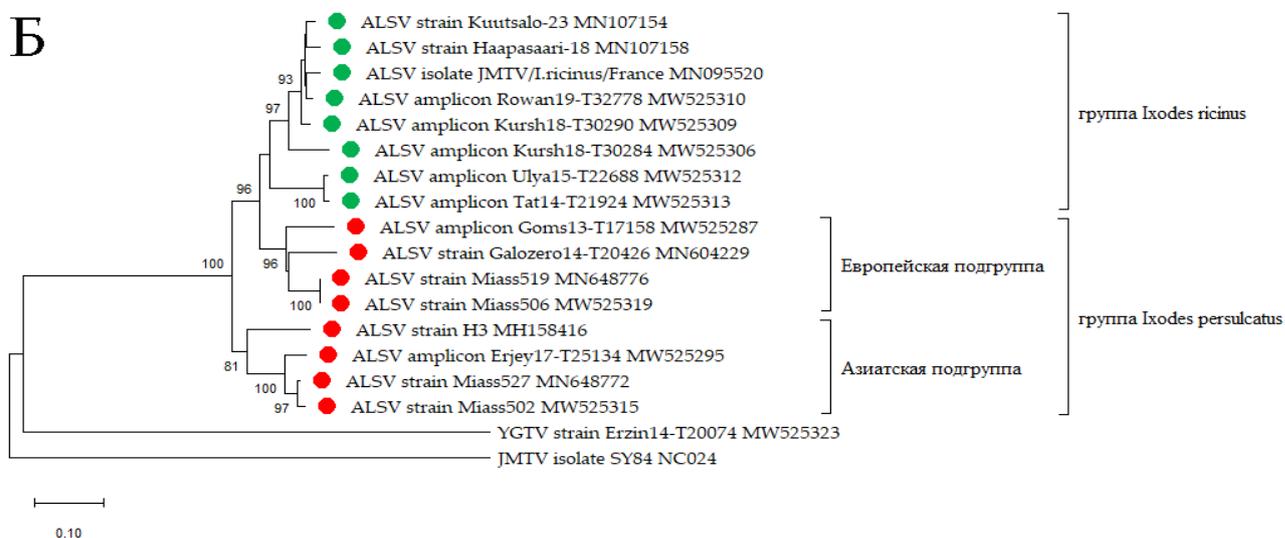
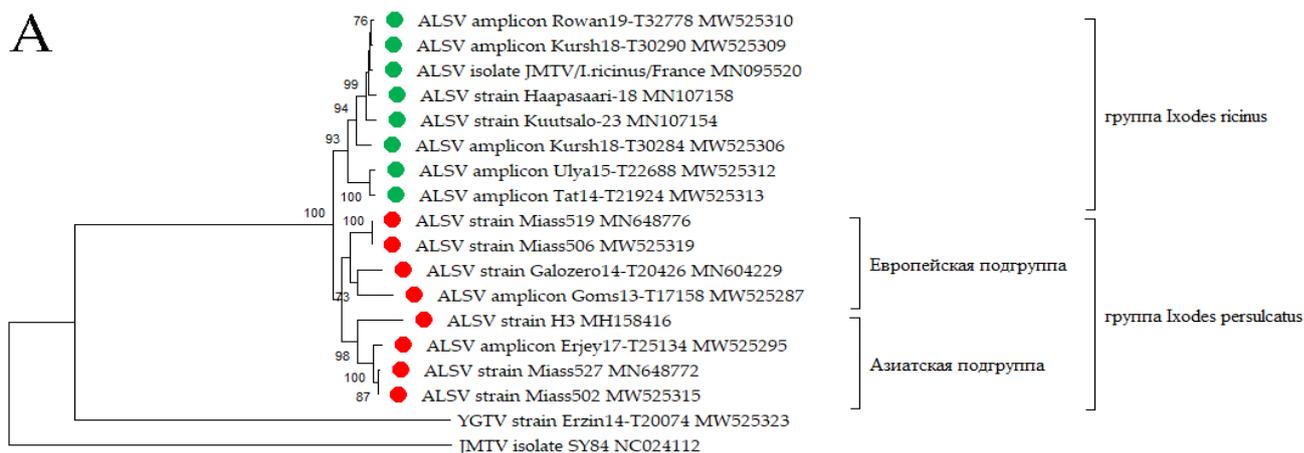


Рисунок 6 – Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков сегмента 2 вируса Алонгшан был выполнен с использованием метода объединения соседей в MEGA X. Красный кружок – группа «*Ixodes persulcatus*», зеленый кружок – группа «*Ixodes ricinus*». **А.** Полная аминокислотная последовательность белка VP1a. **Б.** Полная аминокислотная последовательность белка VP1b. **В.** Полная аминокислотная последовательность белка nuORF. YGTV = вирус Янггоу, JMTV = вирус Джингмен, ALSV = вирус Алонгшан.

Филогенетический анализ по полной аминокислотной последовательности белка nuORF показал наличие только азиатской подгруппы группы «*I. persulcatus*», поддержки других группы не было (Рисунок 6, В). Это может быть связано с тем, что аминокислотная последовательность белка nuORF короткая и высоко консервативна.

Были изучены различия в аминокислотных последовательностях белков VP1a, VP1b и nuORF 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 3). В белке VP1b была найдена только одна замена в позиции 276 (Таблица 3). В белке nuORF специфических замен, характерных для групп «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*», не обнаружено.

Также были обнаружены аминокислотные различия в последовательностях белков VP1a, VP1b и nuORF 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 3).

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 от вида основного вектора, а не только от территории.

Таблица 3 – Специфические аминокислотные замены в белках VP1a, VP1b и nuORF вируса Алонгшан

Позиция аминокислоты в белке	Группа « <i>Ixodes ricinus</i> »	Группа « <i>Ixodes 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*».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флавивирусы показали способность к стремительному расширению 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. здесь можно ожидать появление эпидемически значимых вариантов вирусов, обусловленное сменой переносчиков и/или 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 флавивируса в России.

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

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.

Поскольку мы не могли использовать данные на основе ИФА для оценки распространения ВКЭ, мы составили карту на основе данных Роспотребнадзора о заболеваемости КЭ и литературных источников. Очевидно, что ареал ВКЭ шире, чем показано на карте.

В соответствии с картой, 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*, 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 с использованием панфлави праймеров, специфичных для ВКЭ праймеров и праймеров на вирус Алонгшан.

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 и на южной границе – в республике Тыва. 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 образовали 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 образовали две монофилетические группы. В одну группу вошли только штаммы из республики Тыва, в другой штаммы из Тывы кластеризовались со штаммами, выделенными с близлежащих территорий. 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 клещевого энцефалита ВКЭ или другие флавивирuses 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 вирусофорность клещей рода *Dermacentor* на уровне, а то и выше, вирусофорности клещей рода *Ixodes*, заболеваемость КЭ в районах преобладания клещей рода *Dermacentor* ниже. Причинами это может быть неспособность клещей рода *Dermacentor* длительно поддерживать циркуляцию ВКЭ в отсутствие клещей рода *Ixodes* или то, что в клещах рода *Dermacentor* отбирается менее вирулентный вирус, хуже реплицирующийся в клетках млекопитающих. 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. 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). 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 Янггоу, относящихся к группе Джингмен. 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 сегмента 2 VP1a, VP1b, которые, по-видимому, являются поверхностными структурными белками, показал, что штаммы вируса Алонгшан, выделенные из разных видов клещей и человека, разделяются на группы соответственно месту обитания клещей *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 вируса КЭ и Алонгшан позволяет сделать предположение, что определяющим фактором для этих вирусов является вид основного переносчика: клещи

I. ricinus и *I. persulcatus*. Китайскими учеными получены данные указывающие, что вирус Алонгшан может быть связан с заболеваниями человека. 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, Янггоу и ВКЭ из клещей, собранных на одном маршруте. Дальнейшее изучение сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусов даст ответ о возможном 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Холодилов, И.С. Оценка зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита с использованием различных методов исследования. Неоднозначность трактовки результатов / И.С. Холодилов, О.А. Белова, О.В. Мотузова, А.П. Гмыль, Л.Ю. Романова, В.А. Бойко, Р.А. Крючков, О.Е. Орлова, Н.Д. Пакскина, А.Ф. Шамсутдинов, Г.Г. Карганова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 76. – № 3. – С. 29-36. РИНЦ (ВАК)**
2. **Ružek, D. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines / D. Ružek, T.A. Županc, J. Borde, A. Chrdle, L. Eyer, G. Karganova, I. Kholodilov, N. Knap, L. Kozlovskaya, A. Matveev, A.D. Miller,**

- D.I. Osolodkin, A.K. Överby, N. Tikunova, S. Tkachev, J. Zajkowska // *Antiviral Research.* – 2019. – Vol. 164. – P. 23-51. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014, IF 5,9 WoS.
3. **Kholodilov, I. Ixodid ticks and tick-borne encephalitis virus prevalence in the South Asian part of Russia (Republic of Tuva)** / I. Kholodilov, O. Belova, L. Burenkova, Y. Korotkov, L. Romanova, L. Morozova, V. Kudriavtsev, L. Gmyl, I. Belyaletdinova, A. Chumakov, N. Chumakova, O. Dargyn, N. Galatsevich, A. Gmyl, M. Mikhailov, N. Oorzhak, A. Polienko, A. Saryglar, V. Volok, A. Yakovlev, G. Karganova // *Ticks and Tick-borne Diseases.* – 2019. – Vol. 10. – № 5. – P. 959-969. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.019, IF 3,7 WoS.
 4. **Kholodilov, I.S. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia** / I.S. Kholodilov, A.G. Litov, A.S. Klimentov, O.A. Belova, A.E. Polienko, N.A. Nikitin, A.M. Shchetinin, A.Y. Ivannikova, L. Bell-Sakyi, A.S. Yakovlev, S.V. Bugmyrin, L.A. Bespyatova, L.V. Gmyl, S.V. Luchinina, A.P. Gmyl, V.A. Gushchin, G.G. Karganova // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 362. DOI: 10.3390/v12040362, IF 5,0 WoS.
 5. **Deviatkin, A.A. Baltic group tick-borne encephalitis virus phylogeography: Systemic inconsistency pattern between genetic and geographic distances** / A.A. Deviatkin, **I.S. Kholodilov**, O.A. Belova, S.V. Bugmyrin, L.A. Bespyatova, A.Y. Ivannikova, Y.A. Vakulenko, A.N. Lukashev, G.G. Karganova // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8. – № 10. – P. 1589. DOI: 10.3390/microorganisms8101589, IF 4,1 WoS.
 6. **Rubel, F. Vectors of disease at the northern distribution limit of the genus *Dermacentor* in Eurasia: *D. reticulatus* and *D. silvarum*** / F. Rubel, K. Brugger, O.A. Belova, **I.S. Kholodilov**, Y.M. Didyk, L. Kurzrock, A.L. García ~~Ó. Kozh~~ // *Experimental and Applied Acarology.* – 2020. – Vol. 82. – № 1. – P. 95-123. DOI: 10.1007/s10493-020-00533-y, IF 2,19 WoS
 7. **Kholodilov, I.S. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia** / I.S. Kholodilov, O.A. Belova., E.S. Morozkin, A.G. Litov, A.Y. Ivannikova, M.T. Makenov, A.M. Shchetinin, S.V. Aibulatov, G.K. Bazarova, L. Bell-Sakyi, L.A. Bespyatova, S.V. Bugmyrin, N. Chernetsov, L.L. Chernokhaeva, L.V. Gmyl., A.N. Khaisarova, A.V. Khalin, A.S. Klimentov, I.V. Kovalchuk, S.V. Luchinina, S.G. Medvedev, A.A. Nafeev, N.D. Oorzhak, E.V. Panjukova, A.E. Polienko, K.A. Purmak, E.N. Romanenko, E.N. Rozhdestvenskiy, A.A. Saryglar, A.F. Shamsutdinov, N.I. Solomashchenko, V.A. Trifonov, E.G. Volchev, P.G. Vovkotech, A.S. Yakovlev, O.B. Zhurenkova, V.A. Gushchin, L.S. Karan, G.G. Karganova // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 458. DOI: 10.3390/v13030458, IF 5,0 WoS.