

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Сафонова Марина Викторовна

ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА
ВИРУСА КЕМЕРОВО (*P.ORBIVIRUS*, СЕМ.*REOVIRIDAE*)
НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ

03.02.02 – вирусология

14.02.02 – эпидемиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
кандидат медицинских наук
Дедков Владимир Георгиевич
доктор медицинских наук
Симонова Елена Геннадиевна

Санкт-Петербург – 2022

Содержание

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы.....	15
2.1 Инфекции, передающиеся клещами.....	15
2.1.1 Клещи как переносчики патогенов вирусной природы.....	15
2.1.2 Разнообразие арбовирусов, передающихся клещами.....	17
2.1.3 Этиологическая структура ИПК на территории РФ.....	26
2.2 Общие сведения об объекте исследования.....	27
2.2.1 История изучения вируса Кемерово.....	28
2.2.2 Молекулярно-генетическая характеристика вируса Кемерово.....	30
2.2.3 Эпидемиологическая характеристика вируса Кемерово.....	34
2.2.4 Отношения вируса Кемерово с другими родственными орбивирусами.....	40
2.3 Секвенирование в вирусологии.....	43
2.3.1 Технологии секвенирование первого поколения.....	46
2.3.2 Технологии секвенирование второго поколения.....	48
2.3.3 Технологии секвенирование третьего поколения.....	52
2.3.4 Основные ограничения применения технологий NGS в вирусологии.....	54
2.4 Эпидемический потенциал как мера эпидемиологической опасности...54	
Заключение.....	60
3. Материалы и методы.....	60
3.1 Общая характеристика организации, материалов и методов исследования.....	60
3.2 Расшифровка полных геномов вируса Кемерово.....	63
3.2.1 Нарращивание вируса в культуре.....	63
3.2.2 Экстракция вирусной РНК.....	64
3.2.3 Пробоподготовка для секвенирования вируса <i>de novo</i>	67
3.2.4 Проведение полногеномного секвенирования.....	70

3.2.5 Сборка геномов	71
3.3 <i>In silico</i> анализ.....	72
3.4 Определение концентрации вируса в культуральной жидкости методом ПЦР в реальном времени с использованием РНК-калибраторов.....	74
3.5 Разработка критериев оценки эпидемического потенциала вирусов - возбудителей природно-очаговых инфекций.....	77
4. Результаты и обсуждения.....	84
4.1 Получение геномных последовательностей штаммов вируса Кемерово.....	84
4.2 Сравнительное описание геномов штаммов вируса Кемерово.....	85
4.3 Филогенетический анализ группы вирусов Грейт-Айленд.....	88
4.4 Альтернативные рамки считывания в сегменте 9 вируса Кемерово и их предполагаемое влияние на патогенность вируса.....	95
4.5 Определение видовой принадлежности вирусов группы Грейт-Айленд.....	104
4.6 Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово.....	105
5. Заключение.....	115
6. Выводы.....	120
7. Перспективы дальнейшей разработки темы.....	121
8. Список сокращений.....	122
9. Список использованных источников.....	124
Приложение 1 Сравнительный анализ сегментов генома вируса Кемерово и представителей группы Грейт-Айленд	141
Приложение 2 Структура консервативных терминальных участков.....	147
Приложение 3 Нуклеотидная идентичность вирусов группы Грейт-Айленд по последовательности структурного белка VP1 РНК-зависимой РНК-полимеразы (в %)......	150
Приложение 4 Нуклеотидная идентичность вирусов группы Грейт-Айленд по последовательности структурного субкорового белка VP3 (T2) (в %)......	151

1. Введение

Актуальность темы исследования

На территории Российской Федерации циркулирует большое число возбудителей природно-очаговых болезней, значимое место среди которых традиционно принадлежит инфекциям, передающимся клещами (ИПК). Согласно данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», ежегодно более 50% зарегистрированных случаев заболевания населения природно-очаговыми инфекциями приходится именно на ИПК.

При этом учёту подвергается заболеваемость только по 7 наиболее актуальным инфекциям, в отношении которых на протяжении многих лет осуществляется эпидемиологический надзор: клещевой энцефалит (КЭ), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), клещевые риккетсиозы (сибирский клещевой тиф (СКТ), астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ) и др.), геморрагическая лихорадка Крым-Конго (ККГЛ) и лихорадка Ку (коксиеллёз).

Несмотря на то, что в последние годы наблюдается снижение заболеваемости ИПК, они продолжают представлять серьёзную проблему для здравоохранения страны. Актуальность этой группы инфекций будет сохраняться, поскольку антропогенная нагрузка на природные биотопы возрастает, продолжают формироваться устойчивые антропургические очаги ИПК, в результате которых риск заболевания повышается не только для сельского, но и для городского населения.

Однако вопрос актуальности ИПК в России, особенно вирусной природы, не исчерпывается вышеперечисленными возбудителями. На территории Российской Федерации циркулирует не менее 50 арбовирусов, значительная часть которых переносится именно клещами (Львов, 1989). При этом подавляющее

большинство из них являются малоизученными: регионы их циркуляции не охарактеризованы, эпидемический потенциал неизвестен.

Особый интерес в этом отношении представляют некоторые вирусы рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, который насчитывает 22 вируса, а также семь ещё не классифицированных изолятов, являющихся кандидатами на признание их самостоятельными видами на основании серологических и филогенетических характеристик.

Орбивирусы способны инфицировать широкий круг позвоночных хозяев: диких и домашних животных, летучих мышей, птиц, а некоторые также и человека, но традиционно наибольшее внимание исследователей уделялось четырем представителям рода *Orbivirus*, вызывающим экономически значимые заболевания сельскохозяйственных животных: вирусам синего языка овец (Bluetongue virus, BTV), эпизоотической геморрагической лихорадки (Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV), африканской чумы лошадей (African horse sickness, AHSV) и энцефалита лошадей (Equine encephalosis virus, EEV) (Attoui, 2009). В то же время роль орбивирусов в патологии человека до сих пор не установлена.

В этой связи интересны передающиеся клещами орбивирусы, объединённые в группу Грейт-Айленд, для ряда представителей которой показана способность вызывать лихорадочные состояния и неврологические нарушения при инфицировании человека (Chumakov *et al.*, 1963; Libikova *at al.*, 1970b). Однако вклад их в структуру заболеваемости ИПК остается неизвестным. В настоящий момент в данную группу, помимо собственно вируса Грейт-Айленд (GIV), входят вирус Кемерово (KEMV), вирус Трибеч (TRBV), вирус Муко (MUV), вирус Липовник (LIPV), вирус Бродхэвен (BRDV) и вирус Наггет (NUGV) (King *et al.*, 2012).

Вирус Кемерово (KEMV) – представитель группы Грейт-Айленд, распространённый на территории Российской Федерации, был впервые выделен в 1962 г. группой советских и чехословацких вирусологов под руководством академика М.П. Чумакова в эндемичном очаге клещевого энцефалита в

Кемеровской области. Тогда же для него была доказана антигенная самостоятельность и способность вызывать лихорадочные состояния с симптомами энцефалита у человека (Chumakov *et al.*, 1963). Вирус был отнесён ко II группе патогенности. Вызываемое им заболевание, – лихорадка Кемерово, – является природно-очаговой зоонозной инфекцией с трансмиссивным механизмом передачи (Черкасский, 1996).

Вирус активно изучался вплоть до 70-х годов прошлого столетия. Были определены его физико-химические, биологические и антигенные свойства, но ряд базовых биологических и экологических характеристик, а также роль в патологии человека, не подвергались дальнейшему изучению, и лихорадка Кемерово вскоре перешла в разряд «забытых инфекций с неизвестным эпидемическим потенциалом». В настоящий момент учёт заболеваемости лихорадкой Кемерово не ведётся, специфическая диагностика не осуществляется, случаи заболевания не регистрируются.

Возрастание интереса к изучению вируса Кемерово со стороны вирусологов и эпидемиологов, начавшееся после 2010 года на волне всеобщего внимания учёных к «забытым» инфекциям, позволило пролить свет на некоторые его эпидемиологические и генетические особенности и создать основу для дальнейших исследований (Belhouchet *et al.*, 2010; Dilcher *et al.*, 2012; Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014). Например, с помощью молекулярных методов было показано, что территория циркуляции вируса Кемерово значительна и включает не только Сибирь, как считалось ранее, но и Урал, а также отдельные территории Европейской части Российской Федерации (Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014; Козлова *с соавт.*, 2018)

Современные технологии молекулярного анализа открывают возможности для более глубокого изучения, как самого вируса Кемерово, так и его межвидовых взаимоотношений внутри группы вирусов Грейт-Айленд. Однако в настоящий момент использование этого подхода затруднено ввиду малого количества расшифрованных полногеномных последовательностей. Для вируса Кемерово в открытом доступе представлены полногеномные последовательности всего двух

штаммов (HQ266591-HQ266660; KC288130-KC288139) и несколько фрагментов генома. Для более детального понимания как внутривидовой генетической variability вируса Кемерово, межвидовых взаимоотношений вирусов в группе Грейт-Айленд и оценки эпидемического потенциала необходимо расшифровать больше последовательностей геномов существующих штаммов.

Цель исследования — оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово на основе данных о его генетическом разнообразии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить распространённость вируса Кемерово на территории Российской Федерации на основании современных данных о заражённости иксодовых клещей.
2. Оптимизировать методику приготовления библиотек РНК-содержащих вирусов с двухцепочечным геномом для секвенирования высокопроизводительными методами.
3. Установить последовательность геномов штаммов вируса Кемерово, изолированных из различных источников на территории Российской Федерации.
4. Произвести сравнительный анализ и филогенетическую реконструкцию полученных полногеномных последовательностей.
5. Разработать балльную шкалу оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной этиологии и оценить эпидемический потенциал вируса Кемерово.

Степень разработанности темы исследования

Историю изучения вируса Кемерово можно условно разделить на два периода. Первый период продолжался с момента открытия вируса в 1962 г. до середины 70-х годов. В эти годы были описаны основные свойства вируса, доказана антигенная самостоятельность и способность вызывать энцефалит у

человека (Chumakov et al., 1963; Zemla, 1962; Casals, 1968b; Tihomirova, 1964; Borden et al., 1971).

В этот период исследованию вируса Кемерово были посвящены две диссертационные работы. В одной из них дано сравнительное изучение вирусов группы Кемерово и рассмотрены особенности культивирования вируса Кемерово в культурах ККЭ, ВНК-21, Vero и СПЭВ-44 (Семашко, 1971). Во втором диссертационном исследовании изучены природные очаги вируса Кемерово и его роль в патологии человека (Михайлова, 1974). Впервые изучена зараженность клещей *I. persulcatus* в Кемеровской области, серопревалентность населения, проживающего на эндемичных территориях, и установлена этиологическая связь вируса с лихорадками неясной этиологии, возникшими после присасывания клеща (Михайлова, 1974).

Второй период в изучении вируса Кемерово начался в 2010 году и ознаменовался применением современных молекулярно-генетических методов. На данном этапе ему посвящена одна диссертационная работа, в которой освещены результаты исследования эпидемиологической значимости вируса Кемерово на территории Российской Федерации: выявлены регионы циркуляции, определена вирусоформность переносчиков и показано значительное их разнообразие. Также результатом данной работы является разработка метода детекции РНК вируса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Дедков, 2015).

На современном этапе отечественными и зарубежными учёными получены две полногеномные последовательности вируса Кемерово (Dilcher et al., 2012) и даны первые генетические характеристики вируса Кемерово и других близкородственных представителей группы Грейт-Айленд (Belhouchet et al., 2010; Dilcher et al., 2012; Dedkov et al., 2014a).

В настоящий момент различными исследовательскими коллективами продолжается изучение вирусоформности переносчиков в регионах циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации (Dedkov et al., 2014b; Tkachev et al., 2014; Tkachev et al., 2017; Кривошеина с соавт., 2017; Козлова с

соавт., 2018), при этом исследованию самого возбудителя не уделяется должного внимания.

В настоящий момент степень эпидемиологической опасности возбудителя никак не охарактеризована. Специфическая диагностика вызываемого вирусом заболевания не производится, вклад возбудителя в структуру заболеваемости населения ИПК остаётся невыясненным, при этом риски заражения населения, проживающего на эндемичных в отношении вируса Кемерово территориях, существенно недооценены.

Научная новизна

1. Получены полногеномные последовательности девяти штаммов вируса Кемерово, в том числе впервые – для штамма, изолированного от человека.
2. Впервые оценено внутривидовое генетическое разнообразие вируса Кемерово и механизмы его формирования.
3. Впервые на основании анализа полногеномных последовательностей рассмотрены видовые взаимоотношения представителей группы Грейт-Айленд на геномном уровне.
4. Обобщена и дополнена информация о циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации.
5. Разработана система оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, позволяющая оценить степень эпидемиологической опасности возбудителя в количественном выражении с оценкой ведущего фактора эпидемиологического риска.

Практическая значимость и внедрения

Разработана количественная система оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций, которая может применяться как для

уже известных возбудителей, так и для оценки рисков заражения населения возбудителями новых и возвращающихся инфекций.

Депонированы в международную базу GenBank NCBI 9 полногеномных последовательностей штаммов вируса Кемерово и одна частичная, в том числе полногеномный сиквенс уникального штамма, изолированного от человека.

Разработана методика высокопроизводительного секвенирования двухцепочечных РНК-содержащих вирусов.

Оценена целесообразность включения вируса Кемерово в систему надзора за ИПК.

Полученные результаты использованы в учебно-методической работе при подготовке специалистов биологического и медицинского профиля: включены в состав лекций в рамках семинара ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора «Инфекции, передающиеся клещами: современные требования и организация профилактических мероприятий».

Методология и методы исследования

Методологическая основа работы построена в соответствии с поставленной целью с учётом произведённого обзора научной литературы по теме диссертационного исследования. Проведённое исследование носило комплексный характер и осуществлялось с применением классических вирусологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и эпидемиологических методов. Полученные данные проанализированы, систематизированы и изложены в шести разделах собственных результатов диссертационного исследования. Дано заключение, сформулированы выводы, предложены практические рекомендации и даны перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Вирус Кемерово широко распространён на территории Российской Федерации и циркулирует в рамках глобального природного резервуара в лесных и лесостепных зонах умеренного пояса, являющихся естественными территориями обитания иксодид – переносчиков вируса.
2. Для вируса Кемерово показана способность к множественной внутривидовой сегментной реассортации, для вирусов Трибеч и Муко – способность к межвидовой сегментной реассортации.
3. Вирусы Кемерово, Трибеч и Муко обладают высоким уровнем нуклеотидной идентичности по последовательности субкорового белка VP3, что в сочетании с антигенным сходством, наличием общих переносчиков и возможности межвидовой реассортации позволяет рассматривать их как разные геноварианты одного вида.
4. Влияние альтернативных рамок считывания в сегменте 9 на репликативную активность вируса Кемерово в различных культурах клеток не доказано.
5. Вирус Кемерово обладает средним эпидемическим потенциалом, обусловленным широким ареалом распространения возбудителя, высоким уровнем его генетической изменчивости, поливекторностью и способностью транслоцироваться на большие расстояния в отсутствие регистрируемой заболеваемости, что делает целесообразным включение вируса Кемерово с систему мониторинга возбудителей ИПК.

Личный вклад соискателя

Планирование исследования проводилось при личном участии автора. Также автором внесён вклад в работы, предшествующие диссертационному исследованию: в изучение превалентности вируса Кемерово в популяциях иксодовых клещей на территории Российской Федерации и в оптимизацию

метода пробоподготовки библиотек РНК-содержащих вирусов для высокопроизводительного секвенирования.

Непосредственно автором осуществлялось наращивание штаммов вируса Кемерово в культуре клеток, производилась экстракция РНК из высокотитражной вируссодержащей культуральной жидкости, предварительная пробоподготовка для последующего секвенирования высокопроизводительными методами, количественный анализ репликационной активности вируса в культурах клеток. Также лично автором в полном объёме осуществлялась сборка геномов по референсной последовательности, сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей, их аннотация и депонирование в базу данных GenBank, систематизирование и эпидемиологическая оценка полученных данных.

Диссертационное исследование было выполнено на базе научной группы генной инженерии и биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и поддержано грантом РФФИ №17-74-20096. Высокопроизводительное секвенирование и первичная обработка массива данных производились при содействии научной группы разработки новых методов диагностики на основе секвенирования следующего поколения в лице руководителя группы Хафизова К.Ф., научного сотрудника Сперанской А.С. и младших научных сотрудников Мацвай А.Д. и Пимкиной Е.В. и группы биоинформатики ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в лице руководителя группы Неверова А.Д. и научного сотрудника Федонина Г.Г. Частично исследования также проводились автором на базе лаборатории диагностики вирусных инфекций I-II группы патогенности Федерального казённого учреждения здравоохранения «Противочумный центр» Роспотребнадзора (ФКУЗ ПЧЦ Роспотребнадзора). Работа с коллекцией штаммов вируса Кемерово производилась на базе Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН») в лаборатории биологии арбовирусов и лаборатории биохимии совместно с

заведующей лаборатории арбовирусов Каргановой Г.Г., младшим научным сотрудником лаборатории биохимии Курагиной В.М., заведующим лабораторией биохимии Гмылем А.П. и заведующей лабораторией вирусологии полиомиелита и других энтеровирусных инфекций – референс-центра ВОЗ по надзору за полиомиелитом Козловской Л.И.

В окончательном варианте тема диссертационного исследования была утверждена на заседании Ученого Совета ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора 06.06.2019 года. Завершающая часть исследования, посвящённая разработке и апробации методики оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, осуществлялась на базе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера при участии группы молекулярной генетики патогенных микроорганизмов в лице руководителя группы, старшего научного сотрудника Долговой А.С.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на:

1. Конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвящённой 95-летию основания Омского научно-исследовательского института природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора 15-16 ноября 2016 г. г. Омск (выступление с устным докладом)
2. V Российском конгрессе лабораторной медицины 11-13 сентября 2018г. г. Москва (выступление с постерным докладом)
3. Интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность» 6-8 октября 2020 г. г. Москва (выступление с устным докладом)

В завершённом виде диссертация была обсуждена и рекомендована к защите на заседании апробационной комиссии Ученого Совета ФБУН «Санкт-

Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора 12.02.2020

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пунктам 4, 8 и 9 паспорта специальности 03.02.02 Вирусология, пункту 5 паспорта специальности 14.02.02 Эпидемиология.

Структура и объём диссертации

Диссертация представлена на 151 странице, включает 13 таблиц, 21 рисунок, 4 приложения. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, изложения и обсуждения собственных результатов и выводов. Список использованных источников включает 150 единиц, из них 36 отечественных и 114 зарубежных.

2. Обзор литературы

2.1. Инфекции, передающиеся клещами

2.1.1. Клещи как переносчики патогенов вирусной природы

Не подлежит сомнению тот факт, что организм членистоногого-переносчика является необходимым звеном существования арбовирусов в природе и оказывает влияние на эволюцию вируса (Львов, 1989). Но, несмотря на то, что роль клещей в качестве переносчиков возбудителей инфекционных заболеваний известна уже более 100 лет (Hubálek *et al.*, 2012), знания о взаимодействии вирусов и клещей, равно как и о механизмах их регуляции все ещё достаточно скудны.

Классическая схема циркуляции арбовирусов в природе отражена на схеме, изображённой на Рисунке 1.

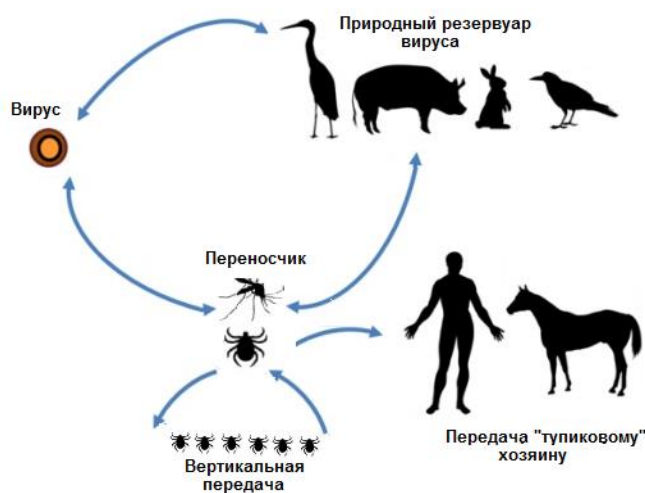


Рисунок 1. Схема циркуляции арбовирусов в природе

Основными её компонентами являются собственно сам вирус, переносчик и резервуар. Человек и восприимчивые сельскохозяйственные животные, как правило, не являются частью природного резервуара арбовируса, а являются т.н. «тупиковыми хозяевами».

У клещей существует ряд особенностей, отличающих их от других кровососущих членистоногих, которые обуславливают ту успешность, с которой они выступают в качестве переносчиков возбудителей инфекционных болезней. Это и особенности пищеварительного процесса, широкий спектр позвоночных-прокормителей и длительный период кормления, гематофагия как способ питания во все постэмбриональные периоды развития (Nuttall and Labuda, 2003; Sonenshine, 2014). Благодаря продолжительному, по сравнению с другими кровососущими членистоногими, сроку жизни клещей, вирус может длительное время выживать в переносчике, передаваться при смене стадий в ходе онтогенеза (трансстадийно). Эти особенности делают клещей не только переносчиками, но и самих по себе – отличным природным резервуаром. Поэтому персистирование переносимых клещами арбовирусов в природе в большей мере обусловлено не горизонтальной передачей вируса от клеща через резервуарного хозяина – другому клещу, а вертикальной – трансвариально, от заражённой самки – к потомству (Nuttall, 2014).

Способность быть переносчиками вирусов доказана только для десятой части известных к настоящему времени клещей – это почти 90 видов (Nuttall, 2008). Среди аргасовых («мягкотелых») клещей переносчиками арбовирусов являются представители родов *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros*. Среди иксодовых («жесткотелых») клещей – это роды *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor* и *Rhipicephalus* (Nuttall, 2014). При этом вирус-векторные взаимодействия у клещей характеризуются большой специфичностью: большинство арбовирусов передаются либо аргасовыми клещами, либо иксодовыми, изредка – и теми, и другими (Labuda and Nuttall, 2004). Зато сами по себе отдельные виды клещей могут являться переносчиками большого числа различных арбовирусов из самых разных вирусных семейств (Bartikova et al., 2017).

Приспособленность арбовируса к определённому переносчику в значительной мере определяется генетически. Вирионы, поступающие в пищеварительный тракт клеща в ходе питания на заражённом хозяине, для

успешного размножения в организме членистоногого должны преодолеть защитные барьеры кишечника и слюнных желез, а также связанные с линькой изменения в тканях для успешной трансстадиальной передачи (Nuttall, 2014). Ко всему прочему, вирус должен уклоняться от взаимодействия с иммунной системой клеща (Hynes, 2014). Поэтому само по себе обнаружение вируса в клеще ещё не свидетельствует о том, что клещ является полноценным звеном в передаче арбовируса. Чтобы однозначно определить клеща как переносчика, необходимо убедиться в соблюдении двух условий: заражение вируса во время питания на заражённом хозяине и передача вируса следующему хозяину уже после прохождения клещом линьки.

2.1.2 Разнообразие арбовирусов, передающихся клещами

Считается, что первые арбовирусы были описаны почти сто лет назад, в 1910 и 1929 годах: ими стали вирус болезни овец Найроби (Nairobi sheep disease virus, NSDV) и вирус болезни Лупинг (Louping ill virus, LIV). На сегодняшний день в мире известно не менее 530 вирусов, переносимых членистоногими (Arbovirus Catalog. Centers for Disease Control and Prevention, <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>), для 160 из которых основными векторами являются клещи (Nuttall, 2014).

«Золотой век» в изучении арбовирусов пришёлся на период с 1960 по 1975 год (Casals, 1967; Casals, 1968b; Albrecht, 1968), когда было выявлено и охарактеризовано большинство известных арбовирусов, но и в настоящее время продолжают появляться сообщения об открытии ранее неизвестных вирусов (Gould et al., 2017).

Интересно, что, несмотря на более чем внушительный период времени, прошедший с момента открытия многих арбовирусов, они по-прежнему считаются «новыми», т.е. обнаруженными недавно патогенами (Шкарин, 2012). К ним также отчасти применимо понятие «возвращающиеся инфекции», которое определяет уже известные инфекции, эпидемиологическая ситуация по которым

изменилась в худшую сторону. Что связано не столько с действительным ухудшением таковой, сколько с развитием новых методов изучения вирусов. На современном этапе изучения арбовирусов с помощью высокочувствительных и специфичных молекулярных методов становятся известны новые данные о распространённости вирусов в природе, разнообразии хозяев и переносчиков, и пр., которые ранее были недоступны в силу несовершенства имеющихся методов исследования. Это привело к возрастанию интереса к проблеме малоизученных арбовирусов и возобновлению их изучения (Gould *et al.*, 2017). Достижения в области молекулярной биотехнологии способствуют не только открытию новых арбовирусов, но и генетической характеристике ранее неклассифицированных вирусов, что приводит к изменениям в их систематическом положении, которое регулярно актуализируется Международным комитетом по таксономии вирусов (Taxonomy Release History, [https:// talk.ictvonline.org /taxonomy/p/ taxonomy _releases](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases)).

Почти 25% из переносимых клещами арбовирусов ассоциированы с болезнями человека и животных (Bartikova *et al.*, 2017). При этом если для одних способность вызывать серьёзные заболевания с высоким риском летальности у человека (вирусы клещевого энцефалита (ВКЭ), геморрагической лихорадки Крым-Конго (ККГЛ)) или животных (вирус африканской чумы свиней (АЧС)), доказана, то другие либо вызывают менее серьёзные патологии, либо случаи заболевания людей слишком редки (например, вирусы Бханджа (BHAV) (Calisher and Goodpasture, 1975; Vesenjак-Hirjan *et al.*, 1977), Авалон (AVAV) (Quillien *et al.*, 1986), Дхори (DHOV) (Бутенко *с соавт.*, 1987), Тюлений (TYUV) (Воинов, 1978) и др.). Однако самую обширную группу арбовирусов, передающихся клещами, представляют вирусы, не имеющие в настоящий момент доказанного медицинского или ветеринарного значения (например, вирусы Трибеч (TRBV) (Gratz, 2006), Укуниими (UUKV) (Oker-Blom *et al.*, 1964; Львов *с соавт.*, 1987; Львов, 1989; Виноград *с соавт.*, 1971), Залив Терпения (ZTV) (Львов *с соавт.*, 1987), Охотский (OKHV) (Lvov *et al.*, 1973), Кло-Мор (CMV) (Main *et al.*, 1976) и др.). Зачастую для них отсутствуют исчерпывающие данные об области

циркуляции, особенностях жизненного цикла, круге хозяев и переносчиков, а также отсутствуют специфические молекулярные диагностикумы. Таким образом, возможные случаи заболевания людей могут либо не фиксироваться вовсе, либо неправильно диагностироваться, а значит их вклад в структуру инфекций, передающихся клещами (ИПК), а в особенности, ассоциированность с возникновением лихорадок неясного генеза после присасывания клеща, остаются невыясненными (Dörrbecker *et al.*, 2010; Hubálek Z. *et al.*, 2012). Учитывая, что симптоматика переносимых клещами арбовирусных инфекций не ограничивается только лихорадочными проявлениями, это может вызывать дополнительные сложности в диагностике.

В соответствии с основными симптомами, можно выделить три группы клещевых арбовирусных заболеваний (Hubálek Z. *et al.*, 2012):

1. Собственно лихорадочные заболевания – с острым началом, характеризующиеся повышением температуры, потливостью, головной болью, слабостью, артралгией и миалгией, иногда – тошнотой, сыпью.
2. Заболевания, протекающие с поражением центральной нервной системы – менингит, менингоэнцефалит или энцефаломиелит, с парезами, параличом и прочими последствиями, вызванными повреждением ЦНС.
3. Заболевания с выраженным геморрагическим синдромом.

Таксономически, передающиеся клещами арбовирусы – гетерогенная группа, включающая представителей разных семейств (Таблица 1). Примечательно, что в подавляющем большинстве они представлены вирусами с РНК-геномом, отрицательной полярности или двухцепочечным.

Таблица 1. Основные переносимые клещами арбовирусы, представляющие опасность для здоровья человека, или являющиеся потенциально патогенными (по данным Bartikova *et al.*, 2017)

Наименование вируса	Вид/Международное название, аббревиатура	Переносчик	География циркуляции	Природный резервуар
Семейство <i>Flaviviridae</i> (оцРНК(+))				
1	2	3	4	5
Вирус клещевого энцефалита	Tick-borne encephalitis virus, TBE	Иксодовые клещи	Европа, Азия	Грызуны
Вирус болезни Лупинг	Louping ill virus, LIV	<i>I. ricinus</i> , <i>I. gibbosus</i>	Британские острова, Испания, Греция, Турция	Мелкий и крупный рогатый скот
Вирус Лангат	Langat virus, LGTV	<i>I. granulatus</i> , <i>I. ricinus</i>	Юго-Восточная Азия, Россия, Британские острова, Норвегия	Крысы, зайцы, куропатки, крупный и мелкий рогатый скот
Вирус Повассан	Powassan virus, POWV	<i>I. cookei</i> , <i>I. marxi</i> , <i>I. scapularis</i>	Канада, Россия, США	Белоногие мыши, белки, сурки.
Вирус болезни леса Кьясанур	Kyasanur Forest disease virus, KFDV	Иксодовые клещи, <i>H. spinigera</i>	Индия	Обезьяны, грызуны, землеройки, летучие мыши
Вирус омской геморрагической лихорадки	Omsk hemorrhagic fever virus, OMSKV	<i>D. reticulatus</i>	Россия	Ондатра, узкочерепная полёвка
Вирусу Гаджетс Галли	Gadgets Gully virus, GGYV	<i>I. uriae</i>	Австралия	Пингвины
Вирус Ройал Фарм	Royal Farm virus, RFV	<i>Ar. hermanni</i>	Афганистан	Голуби
Вирус лихорадки Западного Нила	West Nile virus, WNV	<i>C. maritimus</i> , <i>Ar. hermanni</i> , <i>Hy. marginatum</i>	Россия, Египет	Дикие птицы, в т.ч. морские
Вирус Карши	Karshi virus, KSIV	<i>O. tholozani (papillipes)</i> , <i>Hy. anatolicum</i>	Казахстан, Афганистан	Песчанки
Вирус Тюлений	Tyuleni virus, TYUV	<i>I. uriae</i>	Россия, США, Норвегия	Морские птицы
Вирус Мебан	Meaban virus, MEAV	<i>C. maritimus</i>	Франция	Гуси
Вирус рифа Саумарез	Saumarez Reef virus, SREV	<i>C. capensis</i> , <i>I. eudyptidis</i>	Австралия	Морские птицы

1	2	3	4	5
Вирус Кадам	Kadam virus, KADV	<i>Hy. dromedari</i> , <i>R. parvus</i>	Саудовская Аравия, Уганда	Верблюды, крупный рогатый скот
Семейство <i>Reoviridae</i> (дц РНК)				
р. <i>Coltivirus</i>				
Вирус Колорадской клещевой лихорадки	Colorado tick fever virus, CTFV	<i>Dermacentor</i> <i>spp.</i> , <i>H.</i> <i>leporispalustris</i> ,	США	Мелкие млекопитающие
Вирус Эяч	Eyach virus, EYAV	<i>I. ricinus</i> , <i>I.</i> <i>ventalloi</i>	Франция, Германия	Кролики
р. <i>Orbivirus</i>				
Вирус Ченуда	Chenuda virus, CNUV	<i>Argas spp.</i> , <i>Hy.</i> <i>asiaticum</i> , <i>Carios</i> <i>spp.</i>	Египет, Южная Африка, Азербайджан, США	Морские птицы, голуби, гуси
Вирус Хобар- Горг	Chobar Gorge virus, CGV	<i>Ornithodoros spp.</i>	Непал	Овцы, крупный рогатый скот
Группа вирусов Грейт-Айленд	Great-Island virus group, GIV group	<i>I. spp.</i> , <i>D.</i> <i>marginatus</i> , <i>Argas spp.</i> , <i>Ornithodoros</i> <i>spp.</i> ,	Европа, Россия, США, Канада, Австралия, Япония	Грызуны, дикие птицы, в т.ч. морские
Вирус Вад Медани	Wad Medani virus, WMV	<i>Rhipicephalus</i> <i>spp.</i> , <i>Hyalomma</i> <i>spp.</i> , <i>Amblyomma</i> <i>spp.</i>	Юго- Восточная Азия, Индия, Египет, Судан, Ямайка, Россия, Пакистан, США	Овцы, свиньи, верблюды, буйволы, грызуны, крупный рогатый скот
Вирус Сент- Крокс	St Croix River virus, SCRV	<i>I. scapularis</i>	США	Неизвестен
Неклассифицированные представители				
Вирус Лейк- Кларедон	Lake Clarendon virus, LCV	<i>Ar. robertsi</i>	Австралия	Белые цапли
Вирус Матукаре	Matucare virus, MATV	<i>O. boliviensis</i>	Боливия	Летучие мыши
Семейство <i>Nairoviridae</i> (сегментированная оцРНК(-))				
р. <i>Orthonairovirus</i>				
Вирус Арташат*	Artashat virus, ARTSV	<i>O. alectagalis</i> , <i>O.</i> <i>verrucosus</i>	Армения, Азербайджан	Пятипалый тушканчик
Вирус Тамды (группа вирусов)	<i>Tamdy</i> <i>orthonairovirus</i> , TDYV (Tamdy virus group)	<i>Hy. asiaticum</i> , <i>Hy. plumbeum</i>	Туркменистан, Узбекистан	Овцы

1	2	3	4	5
Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever Orthonairovirus</i> , CCHFV	Иксодовые клещи, <i>Hu. marginatum</i> .	Европа, Азия, Средняя Азия, Африка.	Человек, зайцы, верблюды.
Вирус Дера-Гази-Хан (группа вирусов)	<i>Dera Ghazi Khan orthonairovirus</i> , DGKV	<i>Argas spp.</i> , <i>Hyalomma spp.</i>	Египет, Иран, Пакистан, Тайвань, Австралия, о. Ява, Тайланд, Южная Африка	Голуби, ласточки, верблюды
Вирус Дугбе (группа вирусов)	<i>Dugbe orthonairovirus</i> , DUGV	<i>Amblyomma spp.</i> , <i>R. pulchellus</i>	Африка	Крупный рогатый скот, хомяковые крысы
Вирус Хазара (группа вирусов)	<i>Hazara orthonairovirus</i> , HAZV	<i>I. redikorzevi</i>	Западный Пакистан	Полёвки
Вирус Хугес (группа вирусов)	<i>Hughes orthonairovirus</i> , HUGV	<i>Carios spp.</i> , <i>Ar. arboreus</i> , <i>Ar. cooleyi</i>	США, Мексика, Куба, Перу, Тринидад, Узбекистан, Азербайджан, Британские острова	Чайки, крачки, бакланы и др. морские птицы
Вирус Кетера (группа вирусов)	<i>Keterah orthonairovirus</i> , KTRV	<i>C. pusillus</i> , <i>C. vespertilionis</i>	Малайзия, Кыргызстан, Казахстан	Летучие мыши
Вирус болезни овец Найроби (группа вирусов)	<i>Nairobi sheep disease orthonairovirus</i> , NSDV	<i>R. appendiculatus</i> , <i>H. intermedia</i> , <i>R. haemaphysaloides</i>	Восточная Африка, Индия, о. Шри-Ланка	Мелкий рогатый скот
Вирус Куалуб (группа вирусов)	<i>Qalyub orthonairovirus</i> , QYBV	<i>Ornithodoros spp.</i> , <i>I. uriae</i>	Сенегал, Эфиопия, Египет, Узбекистан	Грызуны
Вирус Сахалин (группа вирусов)	<i>Sakhalin orthonairovirus</i> , SAKV	<i>I. uriae</i> , <i>I. signatus</i>	Россия, Канада, США, Австралия	Морские птицы
Неклассифицированные представители сем. <i>Nairoviridae</i>				
Вирус Чим	Chim virus, CHIMV	<i>R. turanicus</i> , <i>Ornithodoros spp.</i>	Узбекистан	Песчанки
Вирус Эллидей ELL 80-3b*	Ellidaey virus ELL 80-3b	<i>I. uriae</i>	Исландия	Морские птицы
Вирус Фоула F 80-1*	Foula virus F 80-1, FOUV	<i>I. uriae</i>	Шотландия	Морские птицы
Вирус Геран*	Geran virus, GERV/GRNV	<i>O. verrucosus</i>	Азербайджан	Песчанки

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Вирус Гримси GRIMS82-1b*	Grimsey virus GRIMS82-1b, GSYV	<i>I. uriae</i>	Исландия	Морские птицы
Вирус Иннер Фарн-Айленд IF 80-3, IF 80-4*	Inner Farne Island virus	<i>I. uriae</i>	Великобритания	Морские птицы
Вирус Айл-Мей IM81*	Isle of May virus IM81	<i>I. uriae</i>	Шотландия	Морские птицы
Вирус Качемак-Бэй*	Kachemak Bay virus, KBV	<i>I. signatus</i>	США	Морские птицы
Вирус Као-Шуань	Kao Shuan virus, KSV	<i>Ar. robertsi</i>	Тайвань, Австралия, о.Ява	Кваквы
Вирус Микинес M82-2	Mykines virus M82-2, MYKV	<i>I. uriae</i>	Дания	Морские птицы
Вирус Патум-Тани	Pathum Thani virus, PTHV	<i>Ar. robertsi</i>	Тайланд	Аисты-разини
Вирус Претория	Pretoria virus, PREV	<i>Ar. africanus</i>	Южная Африка	Голуби
Вирус Паффин-Айленд*	Puffin Island virus, PIV	<i>C. maritimus</i>	Великобритания	Морские птицы
Вирус Наюн*	Nayun tick virus	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Китай	Неизвестен
Вирус Сауз-Бэй*	South Bay virus, SBV	<i>I. scapularis</i>	США	Неизвестен
Семейство <i>Peribunyaviridae</i> (сегментированная оцРНК(-))				
р. <i>Orthobunyavirus</i>				
Вирус Бакау (группа вирусов)	<i>Bakau orthobunyavirus</i> , BAKV	<i>Ar. abdussalami</i>	Пакистан	Неизвестен
Вирус Эстеро-Реаль	<i>Estero Real orthobunyavirus</i> , ERV	<i>O. tadaridae</i>	Куба	Неизвестен
Вирус Тете (группа вирусов)	<i>Tete orthobunyavirus</i> , TETEV	<i>Hyalomma</i> spp.	Египет, Кипр, Италия	Воробьинообразные
Семейство <i>Phenuiviridae</i> (сегментированная оцРНК(-))				
р. <i>Phlebovirus</i>				
Группа вирусов УкуниEMI	Uukuniemi phlebovirus group, UUKV group	<i>Argas</i> spp., <i>Ixodes</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	США, Африка, Европа, Россия, Пакистан, Австралия	Голуби, хищные птицы, пингвины, лесные и полевые мыши, крупный рогатый скот, воробьинообразные, морские птицы
р. <i>Banyangvirus</i>				
Флебовирус SFTS*	Severe fever with thrombocytopenia virus, SFTSV	<i>H. longicornis</i> , <i>R. microplus</i>	Китай, Япония, США, Корея	Человек

1	2	3	4	5
Неклассифицированные представители сем. <i>Phenuiviridae</i>				
Вирус Бханжа (группа вирусов Бханджа)	Bhanja virus, BHAV (Bhanja virus group)	<i>Haemaphysalis</i> spp., A. <i>variegatum</i> , <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Индия, Италия, Нигерия, Сенегал, Россия, Болгария, Центральная Азия	Мелкий и крупный рогатый скот, африканские ежи, суслики
Вирус Форекария (группа вирусов Бханджа)	Forecariah virus, FORV (Bhanja virus group)	<i>Boophilus geigy</i>	Гвинея	Крупный рогатый скот
Вирус Кисмайо (группа вирусов Бханджа)	Kismayo virus, KISV (Bhanja virus group)	<i>R. pulchellus</i>	Сомали	Домашние животные, верблюды, шакалы
Вирус Кьясоди	Kaisodi virus, KSOV	<i>H. spinigera</i> , <i>H. turturis</i>	Индия	Воробьинообразные
Вирус Ланьян	Lanjan virus, LJNV	<i>D. auratus</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>I. granulatus</i>	Малайзия	Грызуны
Вирус Сильверуотер	Silverwater virus, SILV	<i>H. leporispalustris</i>	Канада, США	Зайцы
Вирус Лон-Стар	Lone Star virus, LSV	<i>A. americanum</i>	США	Еноты
Вирус Раздан	Razdan virus, RAZV	<i>D. marginatus</i>	Армения	Неизвестен
Вирус Сандей-Каньон	Sunday Canyon virus, SCAV	<i>Ar. cooleyi</i>	США	Ласточки
Вирус Вановри	Wanowrie virus, WANV	<i>Hyalomma</i> spp.	Индия, о. Шри-Ланка, Египет, Иран	Овцы
Семейство <i>Orthomyxoviridae</i> (сегментированная оцРНК(-))				
р. <i>Thogotovirus</i>				
Вирус Тогото	Thogoto virus, THOV	<i>A. variegatum</i> , <i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	Камерун, Египет, Эфиопия, Иран, Кения, Сицилия, Уганда	Крупный и мелкий рогатый скот, верблюды, крысы
Вирус Дхори	Dhori virus, DHOV	<i>D. marginatus</i> , <i>Hyalomma</i> spp.	Армения, Азербайджан, Египет, Индия, Португалия, Россия, Саудовская Аравия	Мелкий рогатый скот, верблюды, водоплавающие птицы

1	2	3	4	5
р. Quaranjavirus				
Вирус Куаранфил	Quaranfil virus, QRFV	<i>Argas spp.</i>	Египет, Нигерия, Южная Африка, Афганистан, Иран	Человек, голуби, цапли
Вирус атолла Джонстона	Johnston Atoll Virus, JAV	<i>C. capensis, C. denmarki</i>	Острова Юго-Вост. Азии, Австралия, Новая Зеландия, Юго-Зап. Африка, Франция, Германия	Морские птицы
Семейство Rhabdoviridae (оцРНК(-))				
р. Vesiculovirus				
Вирус Исфахан	Isfahan vesiculovirus, ISFV	<i>Hu. asiaticum</i>	Россия, Иран	Человек, песчанки
р. Ledantevirus				
Ледантевирус Барур	Barur ledantevirus, BARV	<i>H. intermedia, R. pulchellus</i>	Индия, Кения, Сомали	Крысы
Ледантевирус Керн-Каньон	Kern Canyon ledantevirus, KCV	Неизвестно	США	Летучие мыши
Ледантевирус Коленте*	Kolente ledantevirus, KOLEV	<i>A. variegatum</i>	Гвинея	Летучие мыши
Ледантевирус Юнцзя*	Yongjia ledantevirus, YJTV	<i>H. hystricis</i>	Китай	Неизвестно
Вирус Коннектикут	Connecticut virus, CNTV	<i>I. dentatus</i>	США	Кролики
Вирус Нью-Минто	New Minto virus, NMV	<i>H. leporispalustris</i>	США	Зайцы
Вирус Сограс	Sawgrass virus, SAWV	<i>D. variabilis, H. leporispalustris</i>	США	Неизвестно
Неклассифицированные представители сем. Rhabdoviridae				
Вирус Кватта	Kwatta virus, KWA V	<i>H. spinigera, H. turturis</i>	Суринам	Человек, обезьяны, крысы
Семейство Nyamiviridae (оцРНК(-))				
р. Nyavirus				
Вирус Ньяманни	Nyamanini virus, NYMV	<i>Argas spp.</i>	Юж. Африка, Египет, Тайланд, Нигерия, Непал, о. Шри-Ланка	Крупный рогатый скот, цапли
Ниавирус Мидвэй*	Midway nyavirus, MIDWV	<i>C. capensis, C. denmarki</i>	Гавайи, США, Япония	Морские птицы, цапли
Ниавирус Сьерра-Невада*	Sierra Nevada nyavirus, SNVV	<i>O. coriaceus</i>	США	Крупный рогатый скот

* - вирус не внесён в базу данных арбовирусов Arbovirus Catalog. Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/arbocat/>)

2.1.3 Этиологическая структура ИПК на территории РФ

На территории Российской Федерации циркулирует большое число возбудителей природно-очаговых инфекций, значимое место среди которых традиционно принадлежит ИПК. Согласно данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», ежегодно более 50% зарегистрированных случаев заболеваний населения природно-очаговыми инфекциями приходится именно на ИПК (Рисунок 2).

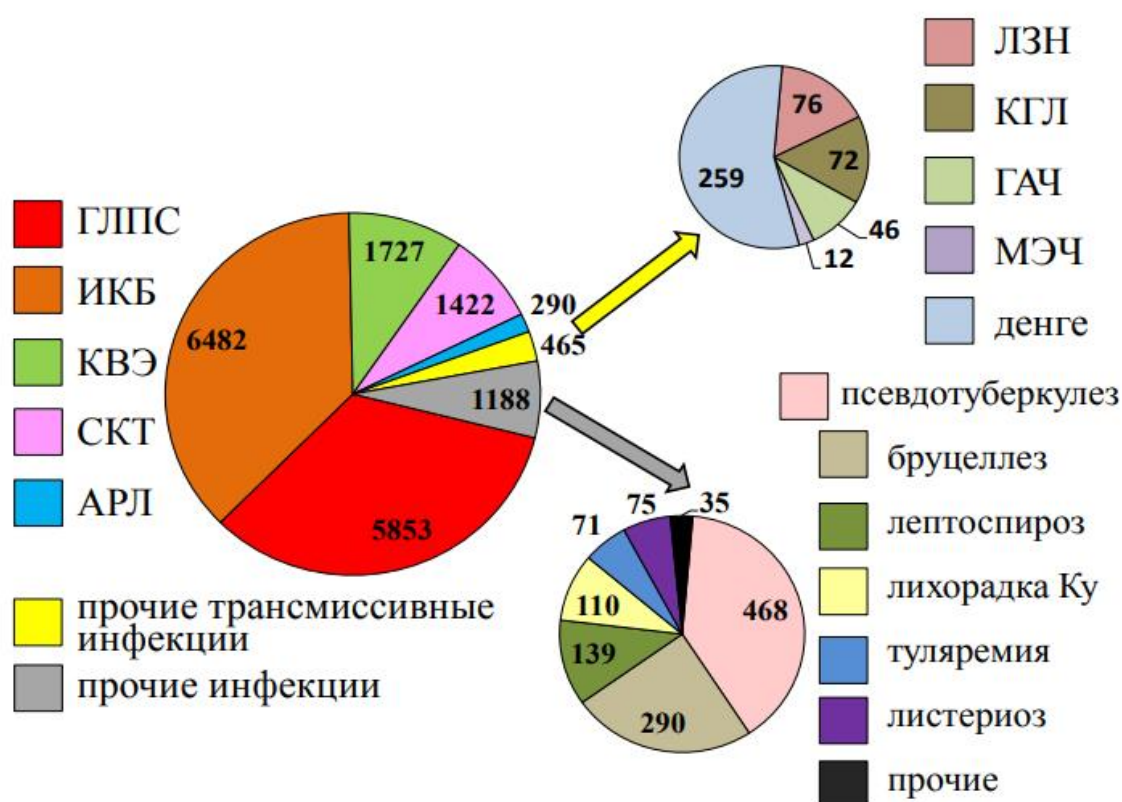


Рисунок 2. Структура заболеваемости природно-очаговыми инфекциями и болезнями, общими для человека и животных в 2018 году, % (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», 2019).

При этом учёту подлежат случаи заболеваний только 8-ю наиболее актуальным инфекциям, в отношении которых на протяжении многих лет

осуществляется эпидемиологический надзор: ВКЭ, ИКБ, МЭЧ, ГАЧ, клещевые риккетсиозы (СКТ, АПЛ), ККГЛ и лихорадка Ку (кокциеллёз).

Несмотря на то, что за последние несколько лет наблюдается тенденция к снижению заболеваемости ИПК, они продолжают представлять серьёзную проблему для здравоохранения страны (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», 2019). Актуальность этой группы инфекций будет сохраняться, поскольку антропогенная нагрузка на природные биотопы возрастает, продолжают формироваться устойчивые антропургические очаги ИПК, в результате которых риск заболевания повышается не только для сельского, но и для городского населения.

Однако вопрос актуальности ИПК в России, особенно вирусной природы, не исчерпывается вышеперечисленными возбудителями. На территории Российской Федерации циркулирует не менее 50 арбовирусов, значительная часть которых переносится именно клещами (Львов, 1989). И подавляющее большинство из них являются малоизученными: регионы их циркуляции не охарактеризованы, эпидемиологический потенциал неизвестен.

2.2 Общие сведения об объекте исследования

То, что проблема ИПК, на территории России (тогда ещё СССР) не ограничивается вирусом клещевого энцефалита, стало очевидно ещё в 60-е годы прошлого века благодаря трудам выдающихся советских вирусологов, таких, как М.П. Чумаков, С.Я. Гайдамович и другие (Семашко, 1971). Уже тогда внимание исследователей привлекали новые клещевые арбовирусы. Среди них – открытый в 1962 году вирус Кемерово, и вызываемое им заболевание, получившее название лихорадка Кемерово (Чумаков *с соавт.*, 1962; Chumakov *et al.*, 1963).

Вместе с несколькими открытыми чуть позже, родственными ему патогенами, вирус активно изучался вплоть до 70-х годов прошлого столетия.

Были определены его физико-химические, биологические и антигенные свойства, но ряд базовых биологических и экологических характеристик, а также роль в патологии человека, не подвергались дальнейшему изучению, и лихорадка Кемерово вскоре перешла в разряд «забытых инфекций». Отчасти это обусловлено экономической неоправданностью, т.к. использовавшиеся в то время традиционные вирусологические методы исследования были достаточно дорогостоящими и трудоёмкими, а кроме того, уже являлись недостаточными для более тщательного изучения.

Возрастание интереса к изучению вируса Кемерово со стороны вирусологов и эпидемиологов, начавшееся после 2010 года на волне всеобщего внимания учёных к «забытым» инфекциям, уже позволило пролить свет на некоторые его эпидемиологические и генетические особенности и создать основу для дальнейших исследований (Belhouchet *et al.*, 2010; Belhouchet *et al.*, 2011; Dilcher *et al.*, 2012; Дедков с соавт., 2012; Dedkov *et al.*, 2014; Tkachev *et al.*, 2014).

2.2.1 История изучения вируса Кемерово

Вирус Кемерово был впервые выделен летом 1962 года группой советских и чехословацких вирусологов под руководством академика АМН СССР М.П. Чумакова в эндемичном очаге клещевого энцефалита в Кемеровской области (Чумаков *с соавт.*, 1962). Первые штаммы были изолированы из собранных в тайге близ деревни Романовка самок клеща *Ixodes persulcatus* и ликвора двух больных, госпитализированных с симптомами лихорадочной формы клещевого энцефалита, возникшего после присасывания клеща. Благодаря разнообразию методик, одновременно применённых исследователями для изоляции, им удалось выявить ряд особенностей выделенного возбудителя, позволивших идентифицировать его как новый, ранее неописанный арбовирус (Чумаков *с соавт.*, 1962). Затем была доказана полная антигенная самостоятельность нового вируса, и по предложению руководителя исследовательской группы, М.П. Чумакова, он получил название вирус Кемерово (Chumakov *et al.*, 1963). Чуть

позже вирус был отнесён роду *Orbiviruses* семейства *Reoviridae*. Основанием к этому послужила относительная стабильность вируса в жирорастворителях, лабильность при pH 3,0 и отсутствие антигенных взаимосвязей с основными серологическими группами арбовирусов (Borden *et al.*, 1971).

Первые данные о размере нового вируса появились ещё в 1962 году, когда методом высокоскоростного ультрацентрифугирования было установлено, что размер частиц вируса Кемерово схож с таковым у вируса клещевого энцефалита и составляет порядка 30 мкм (Zemla, 1962). Фильтрация вируса через фильтры Millipore различного диаметра позволила подтвердить, что размер вирусных частиц составляет менее 50 мкм (Casals, 1968b). Электронно-микроскопическим исследованием ультратонких срезов культуры куриного эмбриона (ККЭ), заражённых вирусом Кемерово, была установлена локализация вирусных частиц в клетке, определена их форма, показаны изменения в структуре зараженных клеток (Тихомирова, 1964). Вирус Кемерово, по результатам данного исследования, имеет округлую или овальную форму, капсид икосаэдрического типа и диаметр порядка 40 мкм.

Вирус Кемерово способен размножаться в тканевых культурах различного происхождения – эпителиальных, соединительно-тканых, полученных от позвоночных и членистоногих. Выраженное цитопатическое действие (ЦПД) вирус вызывает в клетках куриного эмбриона (ККЭ) и некоторых перевиваемых культурах клеток эукариот, таких как клетки почки эмбриона свиньи (СПЭВ), клетки почки сирийского хомячка (ВНК-21), клетки почки зеленой мартышки (Vero), клетки карциномы шейки матки (HeLa) (Karamisheva *et al.*, 1967; Libikova, 1970a). При этом, при сравнительном изучении особенностей культивирования вируса Кемерово в культурах ККЭ, ВНК-21, Vero и СПЭВ-44, достоверных преимуществ какой-либо из культур не выявлено, что показала в своём исследовании И.В. Семашко (Семашко, 1971). При заражении культур клеток вирусом Кемерово характерно раннее проявление ЦПД (в течение 24-48 часов), сопровождающееся деструкцией клеток и накоплением вируса в культуральной среде (Михайлова, 1974). Показана способность вируса реплицироваться в

перевиваемой культуре клеток комара *Aedes albopictus* С6/36 без формирования выраженного ЦПД (Gmyl, 2013).

В экспериментах по инфицированию обезьян штаммом вируса Кемерово, выделенного от больного человека, у животных на 5-7 день после инфицирования показано развитие симптомов менингоэнцефалита. При этом вирус долгое время остаётся активным в мозге заражённых обезьян, проявляя резистентность к действию образовавшихся антител (Libikova *et al.*, 1970b).

Согласно имеющимся данным, антитела против вируса Кемерово могут обнаруживаться в крови здоровых лиц, проживающих на территории Западной Сибири. Однако небольшое число зарегистрированных клинических случаев и трудность дифференциальной диагностики не позволяют окончательно определить роль вируса Кемерово в патологии человека, как этиологического агента лихорадочных состояний, возникающих после присасывания клеща (Libikova *et al.*, 1964).

2.2.2 Молекулярно-генетическая характеристика вируса Кемерово

Геном вируса Кемерово представлен 10 сегментами двухцепочечной РНК и составляет порядка 20 000 пар оснований. Сегменты генома включают гены, кодирующие 7 структурных белков (VP1 - VP7) и 3 неструктурных белка (NS1, NS2, NS3) (Belaganahalli *et al.*, 2015) (Таблица 2)

Как и все представители семейства *Reoviridae*, вирус Кемерово является безоболочечным. Геномная РНК упакована в двухслойный белковый капсид с икосаэдрическим типом симметрии (Рисунок 3). Коровая часть вириона состоит из двух концентрических белковых капсул - субкорового слоя, состоящего из белка VP3 (Т2), и поверхностного слоя, состоящего из белка VP7 (Т13). Несмотря на то, что VP7 является компонентом внутреннего слоя капсида орбивирусов, он доступен для связывания со специфическими антителами, и потому используется для определения серогрупп (Schoehn *et al.*, 1997).

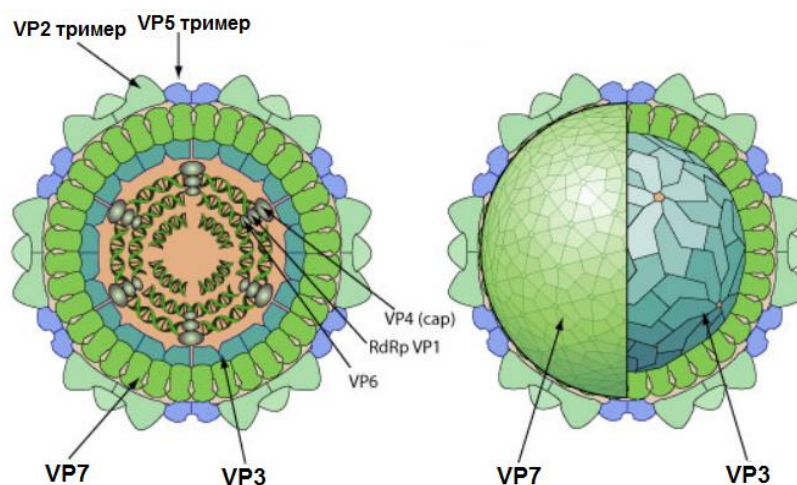


Рисунок 3 Строение частицы орбивирусов (по данным *Orbivirus*: ViralZone <https://viralzone.expasy.org/106>)

Внешний слой вирусной частицы состоит из двух белков VP2 и VP5, опосредующих процесс прикрепления и проникновение вируса Кемерово в клетку хозяина. Благодаря большей вариабельности этих белков по сравнению с коровыми и большинством неструктурных белков, специфичность их реакции с нейтрализующими антителами используется для определения серотипов (Belhouchet *et al.*, 2011; Huismans and Erasmus, 1981). Белки VP1, VP4 и VP6 представлены в самом вирионе незначительно и располагаются вместе с десятью сегментами генома в центральной части кора (O'Hara *et al.*, 1998; Gouet *et al.*, 1999; Belhouchet *et al.*, 2011). Белки VP1 и VP6 (РНК-зависимая РНК-полимераза и хеликаза) являются ферментами и участвуют в процессе транскрипции вирусного генома.

Неструктурные белки NS1, NS2 и NS3 экспрессируются вирусом в инфицированных клетках с матрицы РНК (Belhouchet *et al.*, 2011). NS1 – тубулярный белок, осуществляющий транслокацию собранных провирусных частиц к клеточной мембране (Huismans *et al.*, 1979; Owens *et al.*, 2004; Belhouchet *et al.*, 2011; Dilcher *et al.*, 2012). Белок NS2, подвергнутый фосфорилированию клеточными киназами, в цитоплазме инфицированных клеток превращается в матриксный белок вирусных гранулярных телец включения. Мембранные гликопротеины NS3 и NS3а 10-го сегмента в больших количествах

экспрессируются в клетках насекомых, однако, отсутствуют в клетках млекопитающих. Они вовлечены в процесс сборки вирусных частиц и их освобождения из клетки-хозяина (Hyatt *et al.*, 1993). Существует предположение о том, что эти же гликопротеины могут детерминировать вирулентность и играют роль в адаптации вируса к переносчику (O'Hara *et al.*, 1998).

Таблица 2. Соответствие сегментов генома КЕМV кодируемым вирусным белкам и их функции (по данным (Belaganahalli *et al.*, 2015))

Номер сегмента	Длина сегмента, п.о.	Белок	Функция белка
1	3896	VP1 (Pol)	Фермент РНК-зависимая РНК-полимераза
2	2792	VP3 (T2)	Формирует субкорковый слой капсида
3	1934	VP4 (Cap)	Кэпирующий фермент
4	1730	VP 2	Формирует внешний слой частицы, обеспечивает проникновение вируса в клетку-хозяина, является серотип специфическим антигеном
5	1719	NS1 (TuP)	Неструктурный белок, формирует тубулярные структуры в цитоплазме клетки-хозяина
6	1667	VP5	Формирует наружный капсид
7	1197	NS2 (ViP)	Неструктурный белок, формирует вирусные тельца включения
8	1183	VP7 (T13)	Формирует внешний коровый слой
9	1049	VP6 (Hel)	Фермент хеликазы
10	707	NS3	Неструктурные белки, участвующие в освобождении вирусных частиц из клетки-хозяина

Для генома вируса Кемерово, как представителя РНК-содержащих вирусов, характерна чрезвычайная компактность. Сильное селективное давление, направленное в сторону уменьшения размера генома, привело к появлению ряда стратегий по оптимизации генетической информации, обеспечивающей проникновение вируса в клетку и его воспроизведение (Firth, 2008). В геноме вируса Кемерово компактное кодирование реализуется за счёт альтернативных рамок считывания. В большинстве случаев каждый сегмент генома кодирует лишь один белок, имея одну открытую рамку считывания, но сегменты 9 и 10 могут иметь альтернативную рамку считывания и кодировать по 2 близко

родственных белка (VP6 и VP6a (NS4) в сегменте 9 и NS3, NS3a в сегменте 10, соответственно) (Belhouchet *et al.*, 2011).

Наличие альтернативных рамок считывания в вышеуказанных сегментах – черта, объединяющая представителей рода *Orbivirus* (Рисунок 4).

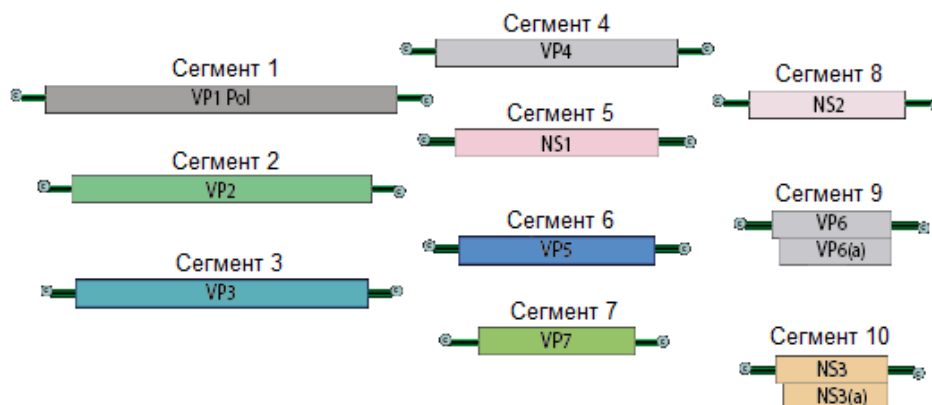


Рисунок. 4 Карта генома орбивирусов (по данным по данным *Orbivirus*: ViralZone <https://viralzone.expasy.org/106>))

Окончательно роль белков вируса Кемерово, получаемых с альтернативных рамок считывания, ещё только предстоит выяснить. Ряд исследователей указывает на наличие гомологий находящихся в альтернативных рамках последовательностей у различных орбивирусов, в том числе и Кемерово, что может указывать на функциональную важность экспрессирующихся с них белков. В частности, таковые показаны для сегмента 9 участка ORF-Ха вирусов Кемерово и Трибеч и N-концевого участка VP6(dBP) вируса Грейт-Айленд (Рисунок 5). При этом известна роль VP6(dBP) в подавлении врождённого иммунитета хозяина при инфицировании. Возможно, что белки вируса Кемерово, получаемые с ORF-Ха, выполняют или выполняли в прошлом схожую функцию (Belhouchet *et al.*, 2011).

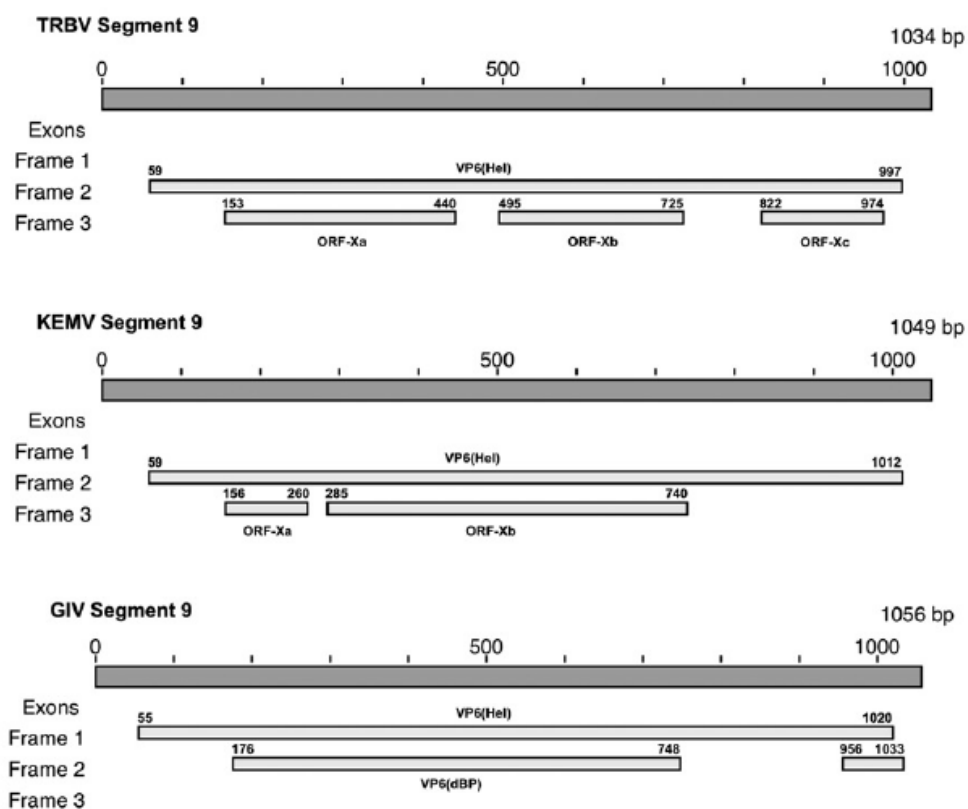


Рисунок 5. Генетическая карта сегмента 9 вирусов Трибеч, Кемерово и Грейт-Айленд (по данным (Stocsits *et al.*, 2005))

2.2.3 Эпидемиологическая характеристика вируса Кемерово.

Согласно эколого-эпидемиологической классификации, вирус Кемерово является возбудителем природно-очаговой зоонозной инфекции с трансмиссивным механизмом передачи, получившей название лихорадка Кемерово (Кемеровской лихорадки) (Черкасский, 1996). Природным резервуаром вируса считаются птицы и мелкие млекопитающие. Тот факт, что в качестве резервуаров могут фигурировать и перелётные птицы, может обуславливать широкую географию регионов, где был изначально и в последующем изолирован вирус Кемерово – Сибирь, Северо-Западная часть России, и даже Египет (Чумаков *с соавт.*, 1962; Schmidt and Shope, 1971), и приводить к его дальнейшему территориальному распространению вдоль путей миграции птиц.

На сегодняшний день известно, что переносчиками вируса Кемерово являются клещи отр. *Ixodida* – собственно иксодовые (сем. *Ixodes*) и аргасовые клещи (сем. *Argasidae*). Существует мнение, что таковыми могут являться и представители отр. *Diptera* (Львов, 1989), но в настоящий момент этому нет объективных доказательств. Также имеются данные филогенетических исследований, согласно которым, в эволюции вируса Кемерово и ряда других, родственных ему орбивирусов, существовал период, когда переносчиками являлись виды сем. *Culicidae*, но затем произошла смена переносчика на некоторых клещей, предков современных иксодид (Dilcher *et al.*, 2012).

Циркуляция вируса Кемерово в природных ареалах изучалась разными исследователями в период с 1963 г., т.е. сразу после открытия вируса, и до 1970 г. Далее интерес к этому патогену стал постепенно угасать (Libikova *et al.*, 1964; Libikova *et al.*, 1965; Карпович, 1965; Изотов *с соавт.*, 1967). При этом оценка результатов ранних исследований даёт основания полагать, что активность вируса Кемерово в природе не всегда остаётся на одном уровне и может изменяться с течением времени. Первая крупная работа, охватывающая продолжительный период наблюдений за очагами вируса Кемерово и позволяющая составить наиболее полноценное представление об интенсивности его циркуляции, была предпринята Л.Н. Тарасевичем в Тогучинском районе Новосибирской области. В данном исследовании методом изоляции вируса из отдельных особей *I. persulcatus* в клетках куриного эмбриона (ККЭ) было установлено, что в период с 1963 по 1967 гг. частота изоляции вируса из клещей постепенно снижалась с 15,3-2,3% вплоть до полного отсутствия изоляций в 1967 г. Достоверное уменьшения активности природных очагов вируса подтверждает тот факт, что за рассматриваемый период времени сходная тенденция наблюдалась в трёх различных фитоценозах (Тарасевич, 1970а; Тарасевич *с соавт.*, 1970б). Заражённость клещей вирусом Кемерово также была рассмотрена И.С. Михайловой. В своей диссертационной работе она подробно изучила 17 070 взрослых особей клещей *I. persulcatus* и *D. pictus*, собранных с 1966 по 1970 гг. в нескольких ландшафтных районах Кемеровской области и показала, что

заражённость клещей вирусом Кемерово существенно не изменялась по годам и составляла 2,1-1,5%, что в 10-20 раз меньше заражённости клещей вирусом клещевого энцефалита (Михайлова, 1974).

В течение нескольких последних лет, в связи с возросшим интересом, проводятся новые исследования по установлению закономерностей циркуляции вируса Кемерово с использованием высокочувствительных молекулярных методов. Первая современная работа по изучению заражённости иксодид вирусом Кемерово была осуществлена в 2013 г. и охватывала двенадцать регионов Российской Федерации, расположенных в Европейской части, на Урале и в Западной Сибири, где с 2005 по 2013 гг. во время плановых мониторинговых мероприятий были собраны 3 694 взрослые особи иксодовых клещей видов *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *D. reticulatus* и *D. nuttalli* и исследованы методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Дедков *с соавт.*, 2012). В результатах этой работы была показана циркуляция вируса Кемерово на изучаемых территориях с широкой вариацией инфицированности клещей в различных регионах. Заражённость клещей *I. persulcatus* имела максимальную вариабельность в различных регионах Российской Федерации, которая изменялась от 10,1% в Вологодской области до нуля в Республике Тыва. Заражённость клещей вида *Ixodes ricinus* варьировала от 4,9% в Московской области до нуля в Ярославской области (Рисунок 6, Таблица 3). Наибольшее количество инфицированных вирусом Кемерово клещей вида *D. reticulatus* отмечалось в Курганской области (4,1%). Случаев инфицирования клещей *Dermacentor nuttalli* выявлено не было (Dedkov *et al.*, 2014b).



Рисунок 6. Территории циркуляции вируса Кемерово в Российской Федерации (по данным (Dedkov *et al.*, 2014b))

Примечание: Федеральные округа: I – Северо-Кавказский, II – Южный, III – Приволжский, IV – Центральный, V – Северо-Западный, VI – Уральский, VII – Сибирский, VIII – Дальневосточный; Области: 1 – Московская, 2 – Ярославская, 3 – Вологодская, 4 – Костромская, 5 – Республика Удмуртия, 6 – Свердловская, 7 – Курганская, 8 – Омская, 9 – Кемеровская область, 10 – Республика Тыва, 11 – Иркутская область.

Таблица 3. Зараженность иксодовых клещей вирусом Кемерово (по данным (Dedkov *et al.*, 2014b))

Регион	Федеральный округ	Исследованные клещи				Положительных образцов (всего)	Зараженность, %	Средняя ошибка, %
		<i>I. persulcatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. nuttalli</i>			
Кемеровская обл.	Сибирский	556	-	-	-	32	5.8	0.99
Свердловская обл.	Уральский	341	-	-	-	4	1.2	0.59
Респ. Удмуртия	Волжский	560	-	-	-	4	0.2	0.42
Омская обл.	Сибирский	239			-	13	5.4	1.47
Иркутская обл.	Сибирский	101	-	-	-	3	3.0	1.7
Курганская обл.	Уральский	241		315	-	27 (14+13)	4.9 (4.1, 5.8)	0.92
Вологодская обл.	Северо-западный	345	-	-	-	35	10.1	1.63
Костромская обл.	Центральный	-	385	-	-	14	3.6	0.95
Московская обл.	Центральный	-	242	-	--	12	4.9	1.39
Ярославская обл.	Центральный	-	104	-	-	0	0	0
Респ. Тыва	Сибирский	36	-	-	95	0	0	0

Ряд проведённых позже исследований дополнил существующую картину. Так, в 2014 г. циркуляция вируса Кемерово была установлена на территории Алтайского края. В результате скринингового исследования, в 2,2% (3 из 134 особей) клещей *I. persulcatus*, собранных на различных территориях субъекта, был обнаружен вирус Кемерово (Дедков *с соавт.*, 2014). Также в 2014 г. вирус Кемерово был обнаружен в Новосибирской и Кемеровской областях в клещах *I. persulcatis* и впервые – в клещах *I. pavlovsky*. Заражённость клещей составила 1,5% (Ткачев *et al.*, 2014). Позже та же группа авторов показала заражённость вирусом Кемерово клещей Северного и Северо-Восточного Алтая, а также восточного Казахстана (Ткачев *et al.*, 2017). В ряде исследованных районов заражённость клещей составила 10% (3 из 30 исследованных особей в Новосибирской области, Салаирский край) и превышала заражённость ВКЭ. В Юго-Западном Алтае и на восточной границе Казахстана заражённость клещей составила 7,7% (2 из 26 особей) и сравнялась с таковой для ВКЭ.

По данным, опубликованным в 2017 году, вирус Кемерово был выявлен в трёх образцах при исследовании 380 клещей *I.persulcatus*, собранных на территории республики Коми. Превалентность вируса составила 0,8 ($\pm 0,2$) % (Кривошеина *с соавт.*, 2017).

По неопубликованным данным, вирус Кемерово также был обнаружен в пулах клещей Приморского края.

Исследование клещей на наличие вируса Кемерово начинает на постоянной основе входить в схему проведения скринингового исследования на ИПК клещей, собранных с территорий, в различных регионах Российской Федерации. Одно из таких исследований было проведено в Тульской области (Козлова *с соавт.*, 2018). Заражённости клещей лесной и лесостепной зон Тульской области вирусом Кемерово выявлено не было.

Таким образом, современные исследования циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации показывают широкую его распространённость не только на территории Сибири, но и в Европейской части страны, чего не было показано в ранних исследованиях. При этом в отдельных регионах инфицированность клещей вирусом Кемерово может даже превосходить таковую для вируса клещевого энцефалита. Появляются данные о новых вероятных переносчиках вируса (Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014).

Несмотря на данные о представленности вируса в природе и очевидную опасность заражения людей при укусе клеща, роль вируса в патологии человека, а значит, и правомерность отнесения возбудителя ко II группе патогенности (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)»), по сей день остаются невыясненными. Выявление случаев заболевания лихорадкой Кемерово осложняется тем, что клиническая картина лихорадки, вызванной вирусом, не имеет патогномоничных признаков и протекает, как большинство лихорадочных состояний, вызываемых множеством других инфекционных агентов, в том числе и возбудителями ИПК. По справочным данным (Черкасский, 1996), первые клинические признаки лихорадки Кемерово развиваются на 4-5 день после присасывания

инфицированного клеща и проявляются подъёмом температуры до 39-40 °С. У больного также отмечается инъекция склер и конъюнктивы, появление пятнисто-папулёзной или мелкоточечной сыпи. Возможно развитие заболевания в форме миокардита или менингоэнцефалита. Естественная восприимчивость людей к инфекции высокая, после заболевания формируется типоспецифический гуморальный иммунитет.

Этиологическую связь вируса Кемерово с возникновением лихорадочных состояний после присасывания клеща впервые попыталась установить И.С. Михайлова в своей диссертационной работе в период с 1966 по 1972 гг., обследуя пациентов в Кемеровской области. Серологические исследования показали этиологическую связь с вирусом Кемерово лишь в 1,1% случаев (7 человек из 694 обследованных лиц). Попытки изолировать вирус из 61 образца крови и 21 образца ликвора оказались безуспешными (Михайлова, 1974).

С момента проведения данной работы прошло уже более 40 лет, в течение которых вирус Кемерово никак не исследовался, и в этой связи новые объективные доказательства патогенности вируса для человека отсутствуют. К настоящему моменту не удалось выявить среди лихорадящих пациентов, имеющих в анамнезе присасывание клеща, лиц, инфицированных вирусом Кемерово. Однако пока вероятность этой взаимосвязи не отрицается, что диктует необходимость дальнейшего изучения вируса Кемерово для получения новых данных и решения вопроса целесообразности проведения эпидемиологического мониторинга.

2.2.4 Отношение вируса Кемерово с другими родственными орбивирусами

Вскоре после открытия вируса Кемерово в 1962 г., были выделены новые инфекционные агенты, обладавшие близкими биологическими и антигенными свойствами. Вирусы были выделены в Чехословакии из клещей вида *I. ricinus*. Первый патоген был выделен из особей имаго, собранных в мае 1963 г. в районе

деревни Липовник (Чехословакия), и получил название по месту изоляции – вирус Липовник (LIPV). Второй, названный также по месту своего открытия вирусом Трибеч (TRBV), был изолирован из нимф клещей, собранных в апреле 1963 г. в биотопах, находящихся в районе одноименной горы на территории Чехословакии (Libikova *et al.*, 1964; Libikova *et al.*, 1965; Gresikova *et al.*, 1965).

На основании антигенного сходства эти три вида вирусов были объединены в одну серогруппу, получившую название «серогруппа Кемерово» (Casals, 1965). В последующие годы из различных источников были выделены другие вирусы, родственные данной серогруппе – из иксодовых и аргасовых клещей, птиц, мелких млекопитающих (Belhouchet *et al.*, 2010; Ernek *et al.*, 1966). Последний представитель серогруппы – вирус Муко, – был описан группой японских учёных в 2015 г. (Ejiri *et al.*, 2015). По мере более детального изучения, некоторые вирусы затем были исключены из группы.

В 2012 г. было пересмотрено и само название группы, после того, как Международный комитет по таксономии вирусов (The International Committee on Taxonomy of Viruses) определил её, как «группу вирусов Грейт-Айленд» (King *et al.*, 2012).

Состав группы на сегодняшний день не утверждён окончательно и постоянно подвергается пересмотру. На постоянной основе в группу включают 7 видов: вирусы Грейт-Айленд (Great Island virus, GIV), Нуггет (Nugget virus, NUGV), Бродхэвен (Broadhaven virus, BRDV), Кемерово (Kemerovo virus, KEMV), Липовник (Lipovnik virus, LIPV), Трибеч (Tribec virus, TRBV) и Муко (Muko virus, MUV). По разным данным, частью группы Грейт-Айленд также является вирус Охотский (Okhotskiy virus, OKHV) (Lvov *et al.*, 1973).

По антигенным свойствам наиболее близкими к вирусам группы Грейт-Айленд являются вирусы Ченуда (Chenuda virus, CNUV), Иери (Ieri virus, IERIV), Вад Медани (Wad Medani virus, WMV).

Взаимоотношения вирусов группы Грейт-Айленд с другими представителями р. *Orbivirus*, в т.ч. переносимыми москитами, можно представить на филогенетическом дереве, предложенном (Belhouchet *et al.*, 2010)

(Рисунок 7). Филогенетически орбивирусы разделяются на 2 группы по стратегии кодирования белков, т.е. одни и те же сегменты кодируют разные структурные и неструктурные белки. Представители группы вирусов Грейт-Айленд формируют отдельную кладу, но при этом занимают пограничное положение между группами. Внутри самой клады вирусы расходятся на две самостоятельные ветви, которые принято считать отдельными серокомплексами (Gorman, 1983). К серокомплексу Кемерово относятся KEMV, TRBV, LIPV и, по всей видимости, также MUV. Серокомплекс Грейт-Айленд включает собственно GIV и другие вирусы, изолированные от морских птиц (Belhouchet *et al.*, 2010).

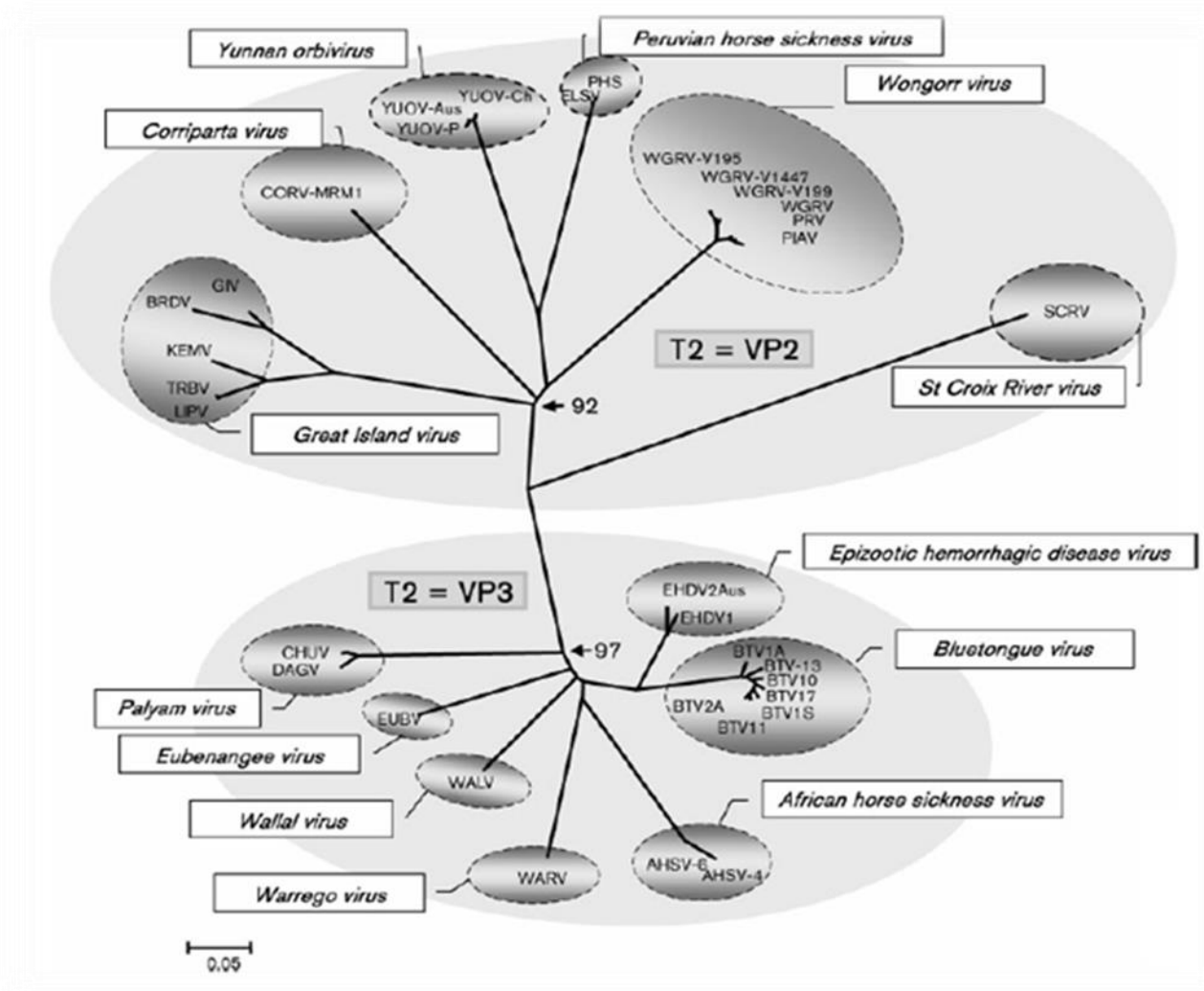


Рисунок 7. Филогенетическое древо орбивирусов, построенное на основании аминокислотных последовательностей белка T2 – основной детерминанты серотипа, являющейся компонентом капсида вирусной частицы (по данным (Belhouchet *et al.*, 2010)).

Предположение о том, что вирусы группы Грейт-Айленд не являются самостоятельными видами, а представляют собой разные штаммы одного вида *Great Island orbivirus*, на сегодняшний день безосновательны, так как действующие критерии видовой принадлежности орбивирусов (The ICTV Report: Online (10th) Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017) явно характеризуют известных представителей группы, как разные виды.

Для представителей группы вирусов Грейт-Айленд было показано наличие такого источника генетического разнообразия, как реассортация (Dedkov *et al.*, 2014a). Учитывая сходность биологических свойств орбивирусов, данный феномен может иметь место и для других вирусов группы, особенно для циркулирующих в зонах симпатрии различных видов клещей и имеющих одного переносчика. В этой связи особого внимания заслуживают данные о широкой распространённости вируса Кемерово на территории Российской Федерации, а также обнаружение его в клещах вида *I. ricinus* (Dedkov *et al.*, 2014b), что создаёт возможность образования реассортантов с вирусом Трибеч.

2.3 Секвенирование в вирусологии

Изучение патогенных биологических агентов сегодня невозможно без применения современных молекулярно-генетических методов: не только в диагностике, терапии и надзоре за заболеваниями, но и в фундаментальных научных областях.

Открытие и последующее распространение сначала подходов к амплификации (Mullis *et al.*, 1986) нуклеиновых кислот, а затем и определению последовательности нуклеотидов в первичной линейной структуре молекулы – секвенированию (Sanger *et al.*, 1977), способствовало бурному развитию наук о жизни.

Усилия, предпринимаемые в области секвенирования вирусов, почти полностью обусловлены их клинической значимостью, однако, полученная информация оказывает значительное влияние на все области вирусологии, от

диагностики, патогенеза и разработки вакцин до изучения экологии и эволюции (Radford *et al.*, 2012). В фундаментальных областях вирусологии распространение секвенирования привело к открытию множества новых, ранее неизвестных, вирусов, позволило более точно определять систематическое положение и устанавливать взаимосвязь между различными видами и группами вирусов (Kahvejian *et al.*, 2008; Barzon *et al.*, 2011; Radford *et al.*, 2012).

Чтобы понять значение метода в целом, и для вирусологии в частности, достаточно проанализировать динамику роста объёма информации в международных нуклеотидных базах данных, например, GenBank, с момента появления первых автоматических секвенаторов до настоящего времени (Таблица 4). В среднем, объём данных увеличивался на 40% ежегодно, что в графическом выражении представляет собой практически логарифмическую кривую (Рисунок 8) Количество опубликованных последовательностей вирусных геномов ежегодно увеличивается, в среднем, на 20% (Benson *et al.*, 2011).

Таблица 4. Статистика базы данных GenBank по числу опубликованных нуклеотидных последовательностей по данным NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>)

Номер отчёта	Дата опубликования	Количество нуклеотидных последовательностей
1	2	3
3	Декабрь 1982	606
14	Ноябрь 1983	2 427
26	Ноябрь 1984	4 393
36	Сентябрь 1985	5 700
46	Ноябрь 1986	9 978
54	Декабрь 1987	15 465
58	Декабрь 1988	21 248
62	Декабрь 1989	31 229
66	Декабрь 1990	41 057
70	Декабрь 1991	58 952
74	Декабрь 1992	97 084
80	Декабрь 1993	150 744
86	Декабрь 1994	237 775
92	Декабрь 1995	620 765
98	Декабрь 1996	1 114 581

Продолжение таблицы 4

1	2	3
104	Декабрь 1997	1 891 953
110	Декабрь 1998	3 043 729
115	Декабрь 1999	5 354 511
121	Декабрь 2000	10 106 023
127	Декабрь 2001	14 976 310
133	Декабрь 2002	22 318 883
139	Декабрь 2003	30 968 418
145	Декабрь 2004	40 604 319
151	Декабрь 2005	52 016 762
157	Декабрь 2006	64 893 747
163	Декабрь 2007	80 388 382
169	Декабрь 2008	98 868 465
175	Декабрь 2009	112 910 950
181	Декабрь 2010	129 902 276
187	Декабрь 2011	146 413 798
193	Декабрь 2012	161 140 325
199	Декабрь 2013	169 331 407
205	Декабрь 2014	179 295 769
211	Декабрь 2015	189 232 925
217	Декабрь 2016	198 565 475
223	Декабрь 2017	206 293 625
229	Декабрь 2018	211 281 415
230	Февраль 2019	212 260 377

Количество геномных последовательностей

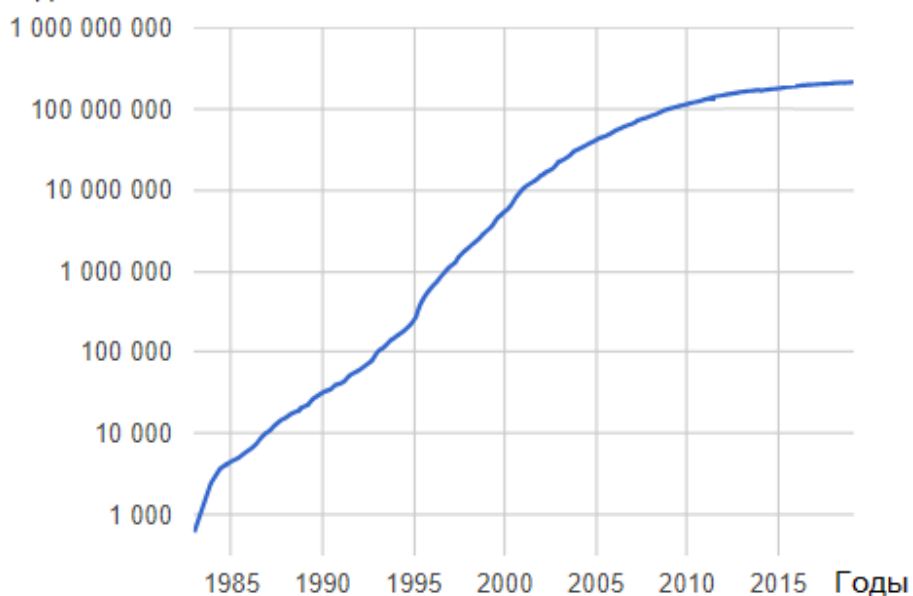


Рисунок 8. Рост числа геномных последовательностей открытой базы данных GenBank с момента возникновения до настоящего времени. По данным NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>).

2.3.1 Технологии секвенирования первого поколения

Первые подходы к установлению первичной нуклеотидной последовательности появились в середине 70-х годов прошлого века, и в настоящее время они объединены под условным названием «секвенирование первого поколения». В их основе лежит детекция сигнала от множества идентичных копий целевой молекулы. При этом исследуемые фрагменты должны быть гомогенны, без примесей иных последовательностей, и иметь сравнительно небольшую длину (100-800 п.о.). К технологиям секвенирования первого поколения относятся метод химической дегградации Максама-Гилберта, опубликованный в США 1977 году (Maxam *et al.*, 1977), и метод терминации синтеза цепи, впервые предложенный в те же годы в Великобритании Фредериком Сенгером (Sanger *et al.*, 1977).

Первый подход, в основе которого лежит химический гидролиз фрагмента ДНК по определённым нуклеотидным основаниям, не получил широкого распространения и был практически полностью вытеснен методом Сенгера, который в настоящее время является признанным «золотым стандартом» секвенирования.

В основе метода Сенгера лежит использование четырёх типов (А, Т, С и Г) меченых дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ) – модифицированных нуклеотидов, попадание которых случайным образом в цепь ДНК на этапе амплификации приводит к остановке синтеза и обрыву строящейся цепи (Рисунок 9). Процесс включения ддНТФ в цепь, получивший название реакции мечения, носит циклический характер, аналогичный ПЦР, и приводит к образованию набора фрагментов различной длины, каждый из которых на 3' конце несёт ддНТФ. Как и в методе Максама-Гилберта, последующее разделение фрагментов ДНК происходит в ходе электрофореза в геле, после чего нуклеотидная последовательность восстанавливается по флуоресцентным меткам, пришитым к каждому из четырёх типов ддНТФ.

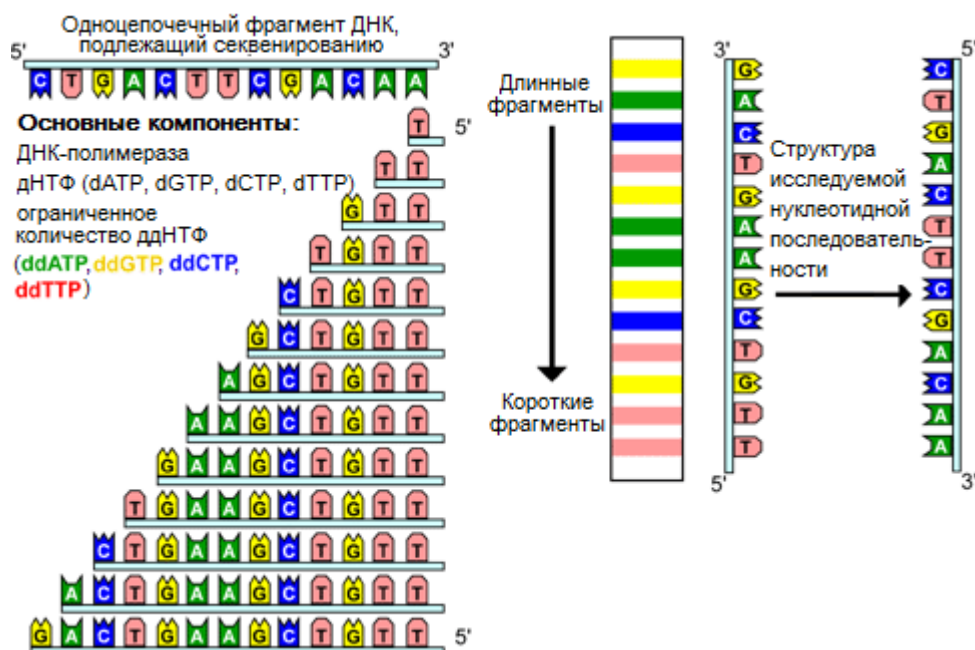


Рисунок 9. Схема метода терминации цепи Сенгера: амплификация исследуемого фрагмента ДНК в присутствии набора флуоресцентно меченных терминирующих дидезоксинуклеозидтрифосфатов, разделение полученных фрагментов в геле и восстановление первичной структуры исследуемой последовательности (адаптированное изображение с сайта <http://biology.reachingfordreams.com/>)

Данный метод реализовался в первых автоматических секвенаторах, которые сочетали в себе собственно метод терминации цепи Сенгера и капиллярный электрофорез для разделения фрагментов, с последующей регистрацией пиков флуоресценции. Анализ данных в случае автоматического капиллярного секвенирования представляет собой прочтение пиков, соответствующих меченому ддНТФ определённого типа, и перевод их в последовательность нуклеотидов. Этот метод позволяет прочесть последовательность нуклеотидов длиной до 1000 п.н. Высокая точность секвенирования и относительно невысокая стоимость анализа образца делают его рутинной процедурой для решения самых разнообразных исследовательских и диагностических задач, связанных с секвенированием небольших фрагментов геномов, выявлением полиморфизмов, мутаций и идентификацией вирусов и бактерий (Ребриков, 2015). Наиболее распространёнными в настоящий момент приборами для автоматического капиллярного секвенирования являются

секвенаторы производства компании Applied Biosystems, которая входит в состав корпорации Thermo Fisher (Applied Biosystems integrated systems for genetic analysis, <https://www.thermofisher.com/>).

2.3.2 Технологии секвенирования второго поколения

Дальнейшее развитие технологий секвенирования шло в направлении автоматизации, увеличения производительности, а также снижения стоимости секвенирования отдельного образца, и на рынок вышли т.н. технологии секвенирования второго поколения, или NGS (next-generation sequencing).

Технологии NGS объединяют различные по своему принципу подходы (Рисунок 10).

Технологии секвенирования ДНК второго поколения

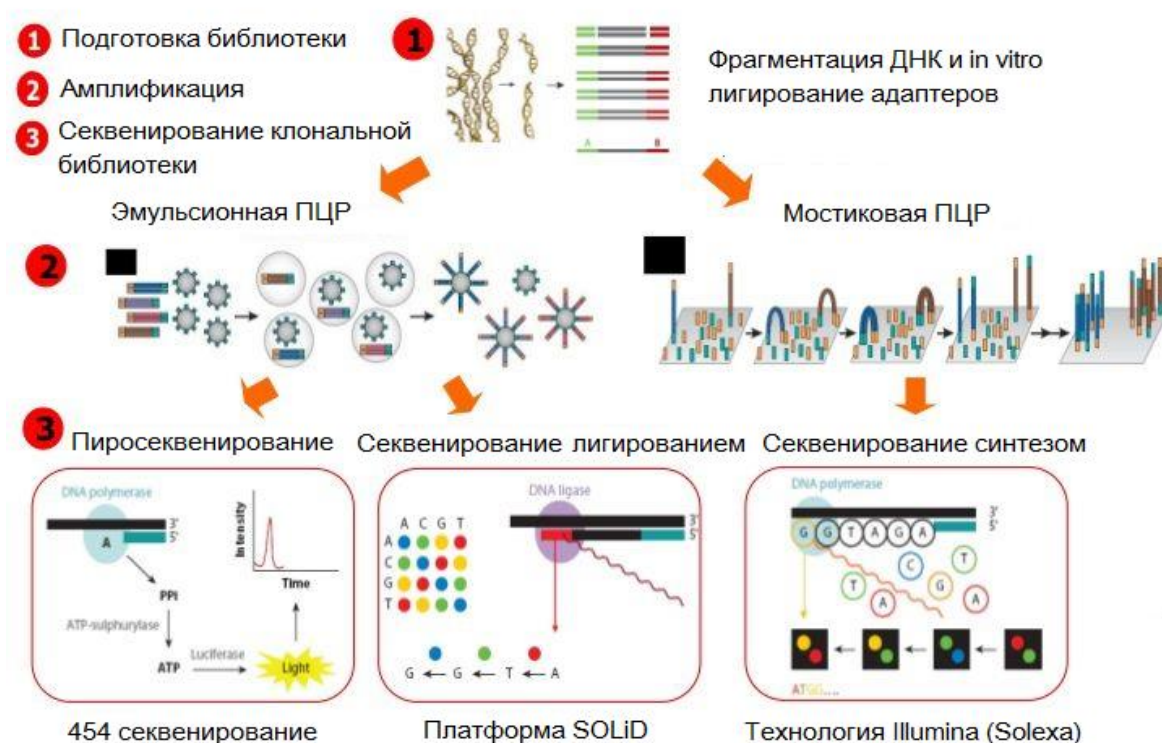


Рисунок 10. Схема технологий секвенирования второго поколения: подготовка библиотек фрагментированной ДНК, обогащение библиотек амплификацией, секвенирование клональных библиотек различными методами (адаптированное изображение с сайта <http://biology.reachingfordreams.com/>)

Однако все они обладают несоизмеримо большей производительностью, превосходящей самые мощные из современных секвенаторов капиллярного типа, а объём получаемых данных может достигать 600 Gb, что эквивалентно миллиардам пар оснований за один запуск (Mardis *et al.*, 2013). Это даёт возможность определять полные последовательности геномов организмов, анализировать экспрессию генов и регуляцию их активности, и пр. (Nowrousian *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011; Baroni *et al.*, 2014).

Основные различия методов высокопроизводительного секвенирования касаются биохимической основы процесса секвенирования, протоколов пробоподготовки и пропускной способности (Таблица 5). Каждый из них в той или иной степени находит применение в секвенировании геномов вирусов, позволяя решать различные задачи. Например, система SOLiD (Life Technologies), характеризующаяся высокой пропускной способностью, но очень коротким чтением, является более подходящей для ресеквенирования геномов и секвенирования последовательностей РНК. Платформы 454 (Roche Diagnostics), Ion Torrent (Life Technologies) и Illumina (Illumina Inc.) больше подходят для решения задач, связанных со сборкой *de novo*. При этом низкая пропускная способность первых двух платформ как раз делает предпочтительным их применение именно для секвенирования небольших вирусных геномов.

Таблица 5. Сравнение основных технологий высокопроизводительного секвенирования второго поколения по данным (Radford *et al.*, 2012)

Технология	Тип адаптера	Метод амплификации	Метод разделения секвенируемых фрагментов	Метод секвенирования	Средняя длина прочтения, п.н.	Средний объём данных за запуск
Roche 454*	Линейные адаптеры	Эмульсионная ПЦР	Матрица с микрореакторами на 1 пкл	Пиросеквенирование	400–700	700 Мб
SOLiD	Линейные адаптеры	Эмульсионная ПЦР	Разделение микросфер на проточной ячейке	Лигирование	50–75	20 Gb
Illumina*	Линейные адаптеры	Мостиковая ПЦР <i>in situ</i>	Гибридизация на проточной ячейке	Обратимая терминация	25–500	600 Gb
Helicos	Поли(А)-адаптер	Без амплификации	Гибридизация на проточной ячейке	Обратимая терминация	25–55	35 Gb
PacBio	Адаптеры-шпильки	Линейная амплификация	Гибридизация с ДНК-полимеразой в микроячейках	Флуоресцентно меченые дНТФ	1000	Нет данных
Ion Torrent*	Линейные адаптеры	Эмульсионная ПЦР	Матрица с микрореакторами	Детекция по образованию свободных ионов H ⁺	35–400	1 Gb

Часть разработанных платформ уже ушла с рынка (например, Roche 454 или Helicos); другие, пройдя несколько модификаций, прочно закрепились на нем (Illumina и Thermo Fisher Scientific).

Возможность использования NGS в вирусологических исследованиях заболеваний оценивается с учётом следующих аспектов (Radford *et al.*, 2012):

1. Уровень затрат. Стоимость методов NGS, как правило, выше, чем у традиционных молекулярных методов, и при планировании исследования это необходимо учитывать. Например, для уточнения небольших фрагментов генома или выявления однонуклеотидных мутаций предпочтительно секвенирование методом Сенгера, а не секвенирование высокопроизводительными методами.

Временные затраты складываются из времени на пробоподготовку, проведения секвенирования и анализа данных. Для большинства задач, связанных

с диагностикой, они являются решающим критерием наравне со стоимостью исследования.

2. Приспособленность конкретной платформы для решения поставленных задач: наличие соответствующих наборов реагентов для пробоподготовки и пр.

3. Пропускная способность метода. Например, для решения задач, связанных с анализом метагеномов, требуется гораздо большая пропускная способность платформы, чем для повторного секвенирования уже известных последовательностей.

4. Точность и длина прочтения.

Высокая точность необходима при тестировании лекарственной устойчивости и детекции точечных мутаций, и менее важна при скрининговых исследованиях и секвенировании *de novo*. Тогда как длина прочтения – наоборот.

5. Автоматизация.

Автоматизация на этапе пробоподготовки позволяет упростить, ускорить и стандартизировать подготовку к процедуре секвенирования, но оправдана она лишь в высокопроизводительных лабораториях, где секвенирование проводится в непрерывном режиме. Некоторые платформы для секвенирования, имеющие достаточно сложные схемы пробоподготовки, уже могут быть дополнены специализированным оборудованием – например, система Ion Chef, предназначенная для проведения полностью автоматизированной пробоподготовки для секвенирования по технологии Ion Torrent.

Развитие и распространение высокопроизводительного секвенирования сопровождается прогрессом программного обеспечения — создаются алгоритмы с открытым программным кодом, появляются открытые источники данных и платформы для вычислений. Новые математические и информационные технологии позволяют геномике развиваться быстрее и использовать более сложные алгоритмы. Эти алгоритмы могут включать в себя сразу несколько приложений и программ и позволяют работать с очень большим объемом данных (Marz *et al.*, 2014).

Технологии секвенирования второго поколения предъявляют повышенные требования к техническому оснащению лабораторий, квалификации персонала, производящего пробоподготовку и анализ данных. Несмотря на то, что методы секвенирования и первого, и второго поколения реализуют различные технологии к определению первичной нуклеотидной последовательности, их объединяет одно общее свойство: они не позволяют секвенировать геномную последовательность непрерывно и предполагают обязательную процедуру фрагментации исследуемой ДНК. В результате, при установлении последовательностей целых геномов приходится оперировать большим объёмом фрагментов, перекрывающих геном случайным образом. Это не затрудняет сборку генома с использованием уже известной референсной последовательности в качестве эталона, но существенно усложняет алгоритмически сборку генома *de novo*. Именно со сборкой *de novo* приходится сталкиваться при изучении новых микроорганизмов и вирусов, а также при решении диагностических задач, связанных с экспресс-идентификацией патогенов, для которых референсные последовательности отсутствуют (Greninger *et al.*, 2015; Mitsuhashi *et al.* 2017). Задача секвенирования протяжённых участков генома без фрагментации, что позволило бы упростить и ускорить сборку геномов *de novo*, в настоящее время по силам только совсем недавно начавшим выходить на широкий рынок технологиям, которые принято объединять под названием «секвенирование третьего поколения».

2.3.3 Технологии секвенирования третьего поколения

Платформа, представленная компанией Helicos Bioscience (США) в 2010 году (Thompson *et al.*, 2010) стала первой появившейся коммерчески доступной технологией протяжённого секвенирования одиночной молекулы, без предшествующего обогащения через амплификацию. Почти одновременно с ней появился секвенатор, разработанный компанией Pacific Bioscience (США). Оба прибора реализуют метод прочтения длинных последовательностей при помощи электронной микроскопии (Bell *et al.*, 2012).

Самым перспективным методом прочитывания одиночных молекул является секвенирование с помощью нанопор (Рисунок 11).

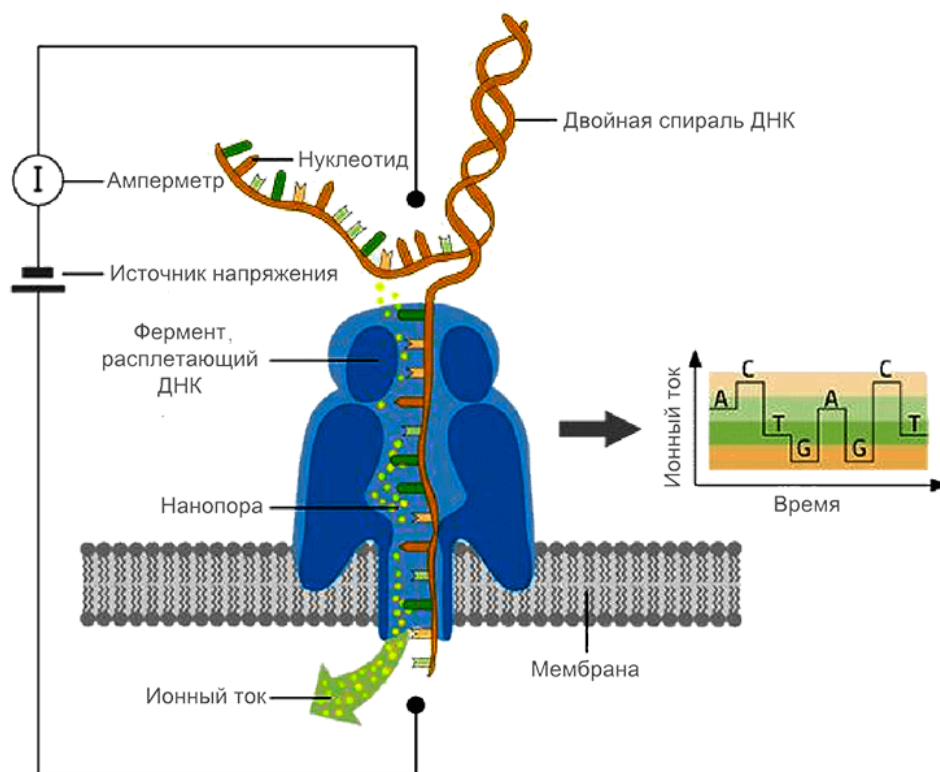


Рисунок 11. Схема работы белковой нанопоры (изображение с сайта <https://biomolecula.ru>)

Метод был предложен ещё в 1996 году (Kasianowicz *et al.*, 1996), и на сегодняшний день в мире разработано несколько технологий нанопорового секвенирования. Первый коммерческий вариант был реализован компанией Oxford Nanopore Technologies в компактных платформах GridION и MinION в 2014 году (Eisenstein *et al.*, 2012), и уже прочно занял свою нишу, вызывая интерес у потребителей из самых разных областей науки и медицины. Он предлагает пользователям упрощённую, по сравнению с предыдущим поколением приборов, пробоподготовку, значительную мобильность и возможность вести секвенирование в режиме реального времени. К недостаткам же нанопоровых платформ относятся, в первую очередь, их низкая производительность и пока ещё высокий процент ошибок в прочтениях. Поэтому при секвенировании геномов *de novo* технологии третьего поколения, как правило, используются не самостоятельно, а в сочетании с платформами второго поколения, что позволяет

устранить взаимные недостатки обеих платформ (Wick *et al.*, 2017). Но подавляющему большинству исследователей все ещё приходится решать задачи полногеномного секвенирования в рамках широко известных технологий первого и второго поколения (Radford *et al.*, 2012), несмотря на то, что возможности повсеместного применения высокопроизводительного секвенирования по-прежнему ограничены его стоимостью, проблемами хранения и обработки больших объёмов генерируемых данных.

2.3.4 Основное ограничение применения технологий NGS в вирусологии

В настоящий момент подходы к секвенированию продолжают развиваться в направлении увеличения вычислительных мощностей, объёма единовременно анализируемых данных. Одним из основных недостатков технологий NGS, ограничивающим результативность их применения в вирусологических исследованиях, является низкая чувствительность при обнаружении вируса в биологическом материале. Поскольку небольшой вирусный геном может практически полностью экранироваться геномом хозяина, гораздо большим по размеру и имеющим большую представленность в образце. Особенно это ограничение актуально, когда вирусная нагрузка в образце низкая. Для повышения разрешающей способности технологий NGS при обнаружении вирусов в настоящий момент применяются разнообразные протоколы пробоподготовки, связанные как с максимальным избавлением от ДНК организма-хозяина, так и с предварительным обогащением материала целевыми фрагментами вирусного генома (Lee *et al.*, 2015).

2.4 Эпидемический потенциал как мера эпидемиологической опасности

По мнению В.В. Малеева, весь спектр инфекционной патологии в настоящем времени остаётся неясным, и его проявления, несмотря на прогрессы в

изучении, способны приводить к возникновению чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера (Малеев, 2006).

Но в настоящее время органы здравоохранения в состоянии лишь эффективно реагировать на уже возникшие эпидемии, а проблеме новой инфекционной патологии не уделяется должного внимания даже в прогнозах развития медицинской науки. Между тем, спектр новых инфекций чрезвычайно широк, и находится в сфере интереса различных научно-исследовательских организаций, что, несомненно, способствует изучению многих аспектов данных инфекций. Специалисты уже обращают внимание на необходимость совершенствования круга задач, стоящих перед современным эпидемиологическим надзором (Симонова, 2017). Одно из первоочередных направлений в этом - расширение спектра рассматриваемых инфекционных болезней (Шкарин и Ковалишена, 2013). Необходимость этого наглядно показало пандемическое распространение новой коронавирусной инфекции, вызванной бета-коронавирусом SARS-CoV2, ставшее неожиданностью для мирового сообщества и уже поспособствовавшее изменению устоявшихся представлений об инфекционной патологии и о месте, занимаемом «новыми инфекциями».

Необходимость совершенствования мониторинга за новыми инфекциями влечёт за собой необходимость создания единой концепции для целостного восприятия проблемы, координации направлений деятельности по изучению новых инфекций, общей оценки эпидемиологической ситуации, своевременного выявления потенциальных угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию. Данная концепция предусматривает существование систем мониторинга этих инфекций, отличающихся от традиционного надзора за уже известными возбудителями. Одной из таких особенностей является осуществление так называемой «предэпидемической диагностики», сопровождающей целенаправленный поиск возбудителей с оценкой степени их опасности. То есть не только выявления новой инфекции, но и определение предпосылок возникновения вызванных ею эпидемиологических осложнений (Шкарин, 2012, Симонова и Сергеевнин, 2018). В отличие от типичных подходов к

предэпидемической диагностике известных возбудителей, основанных на математическом моделировании и прогнозировании эпидемического процесса, предэпидемическая диагностика новых инфекций предполагает рассмотрение эволюционных изменений вирусов, определение различных факторов риска возникновения новых инфекций, отслеживание изменений эпизоотологической ситуации и совокупную оценку эпидемического потенциала возбудителя.

Под эпидемическим потенциалом возбудителя понимается совокупность его свойств, определяющих его способность вызывать эпидемический процесс (Bettencourt and Ribeiro, 2008) и осложнения эпидемиологической ситуации. Иначе говоря, этот показатель отражает эпидемиологическую опасность возбудителя, связанную с риском инфицирования людей (Кисличкина *с соавт.*, 2017). В настоящий момент в литературе отсутствует какая-либо единая система определения эпидемического потенциала возбудителя. Он складывается из совокупности разнородных качественных и количественных показателей, которые влияют на формирование и проявление эпидемического процесса, и могут по-разному учитываться каждым исследователем относительно каждого отдельно взятого инфекционного агента. Поэтому определение эпидемического потенциала может носить достаточно умозрительный характер и не позволяет сравнивать между собой различные возбудители. В свою очередь, без чётко определённых критериев невозможно оценить эпидемический потенциал новых и возвращающихся инфекций, находящихся, по определению В.В. Шкарина *с соавт.*, «в зале ожидания», т.е. находящихся в стадии изучения (Шкарин, 2012).

В связи с всё возрастающим интересом специалистов к данной группе инфекций, все большее внимание уделяется проблемам их мониторинга и разработке подходов к оценке эпидемиологической опасности. На примере пандемии свиного гриппа H1N1 2009 года (Fraser *et al.*, 2009), вспышек ближневосточного респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (MERS-CoV) (Cauchemez *et al.*, 2014) и лихорадки Зика (Campos *et al.*, 2015), а также массовой эпизоотии гриппа птиц d 2003-2004 гг (Liu *et al.*, 2005) было показано, что чрезвычайные ситуации, связанные с новыми инфекциями, могут

представлять серьёзную угрозу для человека и подчёркивают необходимость новых подходов, к выявлению и мониторингу новых инфекционных заболеваний (Osterholm, 2005).

Для этого могут быть применены современные алгоритмы реагирования на вспышки инфекционных заболеваний, объединённые в междисциплинарную область знаний, называемую рядом авторов «аналитикой вспышек» и включающую в себя более широкий спектр подходов, чем традиционный эпидемиологический анализ (Polonsky *et al.*, 2019). Например, проектирование баз данных и разработку мобильных технологий, статистику по частоте и оценку максимального правдоподобия, интерактивную визуализацию, геостатистику, теорию графов, алгоритмы байесовой статистики и генетический анализ (Holmes *et al.*, 2018).

Генетический анализ в данном контексте базируется, преимущественно, на результатах высокопроизводительного секвенирования и связанных с ним технологий молекулярного анализа. Он включает не только определение штаммов родственных изолятов, оценку их происхождения и характера географического распространения, установление смены хозяев и колебаний популяции возбудителя, но и филогенетическую реконструкцию, которая представляет эволюционную историю изучаемых возбудителей (Polonsky *et al.*, 2019). Однако оценка эпидемического потенциала на геномном уровне требует учёта стохастических событий, связанных с генетической изменчивостью, в обширных популяциях патогена, циркулирующего в популяциях резервуарных хозяев и переносчиков (Mogens *et al.*, 2004), что делает предсказание эпидемического потенциала на геномном уровне очень сложным, особенно в случае малоизученных возбудителей, для которых отсутствуют данные о детерминантах патогенности и об уровне и механизмах формирования генетического разнообразия.

При этом значимость оценки факторов формирования генетического разнообразия также отмечается и авторитетными отечественными специалистами. Так, Э.И. Коренберг подчёркивает, что изучение внутривидовой гетерогенности возбудителя является одной из наиболее важных задач для

понимания его патогенеза, эпизоотического и эпидемического процесса (Коренберг, 2010). Поэтому оценка эпидемического потенциала новых инфекций тесно сопряжена с необходимостью изучения их фундаментальных основ, а сам эпидемический потенциал представляет собой динамическую величину, которая может изменяться с появлением новых данных об эколого-генетических основах существования, механизмах изменчивости изучаемых возбудителей.

Заключение

Несмотря на возрастающий интерес научного сообщества к проблеме новых и возвращающихся инфекций, которые в будущем могут стать эпидемиологически значимыми, информация, представленная для вируса Кемерово и других родственных ему представителей группы Грейт-Айленд скудна и зачастую, противоречива. В дальнейших масштабных исследованиях нуждаются многие вопросы изучения биологии вируса Кемерово, его циркуляции в природных ареалах, эволюции и взаимосвязи с родственными вирусами.

Отчасти дальнейшие исследования затруднены ввиду малого количества расшифрованных полногеномных последовательностей. Новые штаммы вируса Кемерово не выделялись более 40 лет, но и последовательности геномов уже существующих штаммов по-прежнему остаются не расшифрованными. Вместе с тем, современные технологии молекулярного анализа уже позволяют существенно обогатить объём доступной информации об исследуемом патогене и проанализировать его на ранее недоступном уровне.

Настоящее исследование представляет собой первую попытку получить большой объём последовательностей полных геномов представителей группы Грейт-Айленд в рамках одной работы с помощью высокопроизводительного секвенирования. Полученные данные не только существенно дополняют информацию о генетическом разнообразии вируса и его взаимоотношениях с близкородственными вирусами, но и откроют возможности проведения других исследований, основанных на изучении вирусов группы Грейт-Айленд

непосредственно на уровне генома. Совершенно очевидно, что изучение вируса Кемерово имеет не только фундаментальный научный интерес, но и представляется важным с учётом имеющихся данных о возможном вкладе вируса в заболеваемость людей лихорадками неясного генеза, возникающими после присасывания клеща. Обобщение имеющихся данных о фундаментальных эколого-генетических особенностях вирус Кемерово, оценка его эпидемического потенциала позволят сформировать целостное восприятие о данном возбудителе, необходимость которого обусловлена необходимостью совершенствования систем мониторинга и контроля за арбовирусными инфекциями.

3. Материалы и методы

3.1 Общая характеристика организации, материалов и методов исследования

В работе были использованы 10 штаммов вируса Кемерово из коллекции Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН»), изолированные из различных источников в период с 1962 по 1973 гг. (Таблица 6).

Таблица 6. Описание исследуемых штаммов вируса Кемерово из коллекции ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН»

№	Наименование штамма	Источник изоляции	Регион изоляции	Год изоляции	Кем изолирован
1	61	<i>I. persulcatus</i>	Алтайский край	1973	Бычкова М.В.
2	37	<i>I. persulcatus</i>	Алтайский край	1973	Бычкова М.В.
3	101	<i>I. persulcatus</i>	Кемеровская область	1970	Баннова Г.Г.
4	R10	<i>I. persulcatus</i>	Кемеровская область	1962	Либикова Е.О.
5	5/1	<i>I. persulcatus</i>	Кемеровская область	1969	Караванов А.С.
6	L75	Человек	Кемеровская область	1962	Либикова Е.О.
7	205	<i>I. persulcatus</i>	Вологодская область	1974	Баннова Г.Г.
8	483	<i>I. ricinus</i>	Вологодская область	1975	Баннова Г.Г.
9	106	<i>I. persulcatus</i>	Алтайский край	1973	Бычкова М.В.
10	k10	<i>I. persulcatus</i>	Кемеровская область	1966	Бычкова М.В.

подавляющее большинство штаммов вируса изолировано от переносчиков - клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. Один штамм, полученный от человека, был выделен Либиковой Е.О. в 1962 г. в Кемеровской области от больного человека с

симптомами асептического менингита, и в настоящее время является единственным сохранившимся штаммом, изолированным от больного лихорадкой Кемерово.

Накопление вируса и экстракция вирусной РНК производились на базе ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН» в лаборатории биологии арбовирусов и лаборатории биохимии совместно с заведующей лабораторией арбовирусов Каргановой Г.Г., младшим научным сотрудником лаборатории биохимии Курагиной В.М. и заведующим лабораторией биохимии Гмылем А.П. Работы производились в соответствии с требованиями безопасности при работе с микроорганизмами II группы патогенности (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)»).

Для полногеномного секвенирования в данной работе использованы высокопроизводительные методы, основанные на технологии секвенирования синтезом, позволяющие одновременно процессировать несколько образцов с высокой степенью покрытия генома (Osborne *et al.*, 2000). Перед проведением процедуры высокопроизводительного секвенирования исходная РНК подвергалась модификации путём создания набора случайных фрагментов определённого диапазона длин, с соответствующей структурой, иначе называемого библиотекой (Ребриков, 2014). С учётом особенностей организации генома вируса Кемерово в стандартную процедуру пробоподготовки для полногеномного секвенирования был включён предварительный этап получения кДНК на базе исходной дцРНК на основе подхода (Maan *et al.*, 2007), модифицированного Дедковым и соавторами (Дедков, 2016). Данный подход включал этапы избавления вирусной дцРНК от остаточной ДНК и оцРНК клетки-хозяина, неспецифическую реакцию обратной транскрипции и амплификацию фрагментов кДНК. Затем амплифицированная кДНК проходила процедуру стандартной пробоподготовки до получения готовых библиотек, предусмотренную используемой коммерческой платформой для высокопроизводительного секвенирования.

Пробоподготовка дцРНК, приготовление библиотек, проведение процедуры высокопроизводительного секвенирования, обработка результатов, сборка геномов и *in silico* анализ осуществлялись в лаборатории биотехнологии и генной инженерии ФБУН Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Заражение культур клеток для наращивания вируса, экстракция РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости и получение кДНК для приготовления библиотек для высокопроизводительного секвенирования осуществлялись лично автором.

Проведение процедуры высокопроизводительного секвенирования выполнялось научным сотрудником группы генной инженерии и биотехнологии Сперанской А.С. и младшим научным сотрудником группы генной инженерии и биотехнологии Пимкиной Е.В.

Первичная обработка массива данных, полученных в ходе высокопроизводительного секвенирования, производилась при содействии группы биоинформатики ФБУН Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в лице руководителя группы Неверова А.Д. и научного сотрудника Федонина Г.Г., а также научной группы разработки новых методов диагностики на основе секвенирования следующего поколения в лице руководителя группы Хафизова К.Ф. и младшего научного сотрудника Мацвай А.Д.

В ходе сборки полногеномных последовательностей исследуемых штаммов в ряде случаев требовалось дополнительное капиллярное секвенирование методом Сенгера, которое осуществляли младшие научные сотрудники научной группы генной инженерии и биотехнологии Валдохина А.В. и Буланенко В.П.

Сборка геномов по референсу, постановка полимеразной цепной реакции для последующего проведения дополнительного секвенирования методом Сенгера, *in silico* анализ полученных данных производились лично автором.

3.2 Расшифровка полных геномов вируса Кемерово

3.2.1 Нарращивание вируса в культуре

Вирус Кемерово размножали в двух перевиваемых культурах клеток, т.к. разные штаммы вируса показывали способность к росту в клетках определённых культур. Штаммы KEMV 37, KEMV 61, KEMV 101, KEMV R10, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483 выращивались в культуре клеток почки эмбриона свиньи версенизированных (СПЭВ), штамм KEMV 106 выращивался в культуре клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21). Штамм KEMV k10 демонстрировал способность к росту в обеих культурах, поэтому его наращивали и в культуре клеток СПЭВ, и в культуре клеток ВНК-21.

Заражение культуры клеток СПЭВ:

1. Чистые культуры клеток СПЭВ наращивали в CO₂ инкубаторе до появления монослоя в культуральных флаконах с площадью поверхности 225 см² на среде Моргана-Мортон-Паркера с солями Хенкса (среда 199) с 2% содержанием фетальной бычьей сыворотки.
2. Ростовую среду сливали из флаконов и отмывали монослой от остатков ростовой среды кратковременным обкатыванием с 40 мл бессывороточной среды 199. Отмывочную среду удаляли.
3. На монослой вносили 2 мл вирусосодержащей культуральной жидкости.
4. Флаконы, содержащие инокулят, обкатывали с интервалом 5-10 минут в течение 1 часа.
5. По окончании обкатки во флаконы добавляли 40 мл полной среды.
6. Флаконы с заражённой культурой помещали в CO₂-инкубатор для наращивания вируса.

Заражение культуры клеток ВНК-21

1. Чистые культуры клеток ВНК-21 выращивались роллерным методом в бутылках с площадью поверхности 850 см² на модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с 2% содержанием фетальной бычьей сыворотки.

2. Ростовую среду сливали из бутылей и отмывали монослой от остатков ростовой среды кратковременным обкатыванием с 40 мл бессывороточной бессывороточной ДМЕМ. Отмывочную среду удаляли.
3. В бутыль вносили 2 мл вирусосодержащей культуральной жидкости.
4. Бутыли непрерывно обкатывали в течение 1 часа.
5. По окончании обкатки в бутыли добавляли 40 мл полной среды.
6. Бутыли с заражённой культурой помещали в роллер-инкубатор для наращивания.

Вирус наращивали в заражённых культурах в течение 48-72 часов при 37°C до наступления ЦПД (Семашко, 1971; Михайлова, 1974), затем вирусосодержащую культуральную жидкость отбирали для последующего выделения РНК.

3.2.2 Экстракция вирусной РНК

Объём вирусосодержащей культуральной жидкости, полученной с флаконов, составлял 40-45 мл. Для выделения вирусных частиц культуральную жидкость центрифугировали на ультрацентрифуге Beckman Coulter серии Optima с использованием стандартного ротора SW-28.

Для получения высокоочищенного продукта, РНК из вирусных частиц экстрагировали дважды смесью кислого фенола (pH=5) и хлороформа (в объёмном соотношении 1:1).

Методика экстракции:

1. Вирусосодержащую культуральную жидкость освобождали от клеточного дебриса центрифугированием при 10 000 об/мин (18 000 g) в течение 30 минут при 4°C.
2. Свободный от остатков клеток супернатант в объёме 32-40 мл отбирали в чистую центрифужную пробирку.

При проведении экстракции из культуральных жидкостей, содержащих штаммы KEMV 37, KEMV R10 и KEMV k10 на дно центрифужных пробирок дополнительно подслаивали 3 мл 30% раствора сахарозы (20mM Трис (pH 7,5),

- 1М хлорида натрия), для дополнительной очистки вирусной РНК от балластных нуклеиновых кислот.
3. Вирусные частицы осаждали из супернатанта ультрацентрифугированием при 25 000 об/мин (112 500g) в течение 4 часов при 4°C. Супернатант удаляли.
 4. Осадок вирусных частиц тщательно ресуспендировали в 600 мкл Tris-Натрий-ЭДТА-буфера (10мМ Trис, 100мМ хлорида натрия, 1мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА); pH=8.0).
 5. Суспензию вирусных частиц переносили в 1,5 мл пробирки и добавляли 10% (вес/объём) додецилсульфата натрия (SDS), до конечной концентрации 1%.
 6. К подготовленной суспензии вирусных частиц добавляли равный объём смеси фенола и хлороформа (в объёмном соотношении 1:1). Тщательно встряхивали в течение 1-2 минут.
 7. Центрифугировали 14 680 об./мин (20 000g) в течение 8 минут при 4° С
 8. Верхнюю (водную) фазу отделяли и повторно добавляли к ней равный объём смеси фенола и хлороформа (в объёмном соотношении 1:1). Тщательно встряхивали в течение 1-2 минут.
 9. Центрифугировали при 14 680 об/мин (20 000g) в течение 8 минут при 4°C.
 10. Верхнюю (водную) фазу отделяли и добавляли к ней 5М ацетат аммония до конечной концентрации 1М, затем три объёма 96% этанола. Тщательно встряхивали.
 11. Полученную смесь выдерживали при -80 °С в течении часа.
 12. Осаждали РНК центрифугированием при 14 680 об/мин (20 000g) в течение 15 минут при 4°C. Супернатант удаляли.
 13. Осадок отмывали 80% этанолом, после чего центрифугировали при 14 680 об/мин (20 000g) в течение 8 минут при 4°C.
 14. Досуха удаляли супернатант, и высушивали осадок в эксикаторе под вакуумом в течение 30 минут.
 15. Высушенный осадок растворяли в свободной от РНК-аз воде RNase-free water (Qiagen, Germany).

Качество полученной РНК оценивали электрофоретическим методом в 1% агарозном геле с использованием буфера 1x TBE и добавлением бромистого этидия. На гель наносили 5 мкл РНК, смешанной с 1 мкл красителя 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Для поддержания РНК в ходе электрофореза в денатурированном состоянии в электрофорезный буфер 1x TBE был добавлен 10% додецилсульфата натрия (SDS) из расчёта 600 мкл на 1 л буфера.

Электрофорез проводили в течении 1,5 часов при напряжении 80 В. В качестве маркера длин на фореуз дополнительно наносили GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) с диапазоном длинн 100 - 10 000 п.о. (Рисунок 12)

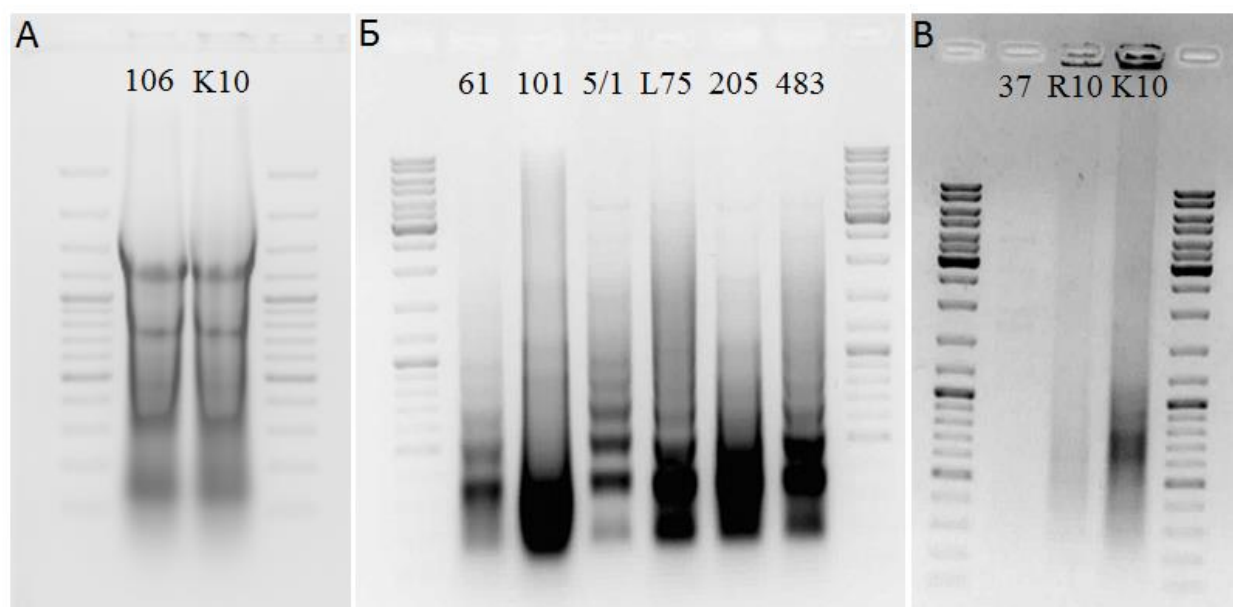


Рисунок 12. Электрофореграмма РНК, экстрагированной из вирусных частиц.

Примечание:

А – РНК штаммов KEMV 106 и KEMV k10, выращенных в культуре клеток ВНК-21;

Б – РНК штаммов KEMV 61, KEMV 101, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483, выращенных в культуре клеток СПЭВ.

В - РНК штаммов KEMV 37, KEMV R10, KEMV k10, выращенных в культуре клеток СПЭВ, с включением сахарозной подушки на этапе ультрацентрифугирования.

3.2.3 Пробоподготовка для секвенирования вируса *de novo*

Секвенирование реовирусов традиционными методами представляет определённую сложность ввиду того, что обратная транскрипция геномной дцРНК реовирусов, являющаяся неотъемлемым этапом пробоподготовки, проходит с очень низкой эффективностью. В результате, прочитываются преимущественно короткие концевые фрагменты (Maan *et al.*, 2007).

Поэтому для подготовки материала к последующему секвенированию высокопроизводительными методами РНК исследуемых штаммов проходила специальную модификацию. Предложенный подход был ранее успешно применён для полногеномного секвенирования штамма вируса Кемерово КЕМV 21/10. Схематично он представлен на Рисунке 13 и предполагает обязательные этапы избавления от балластной ДНК и оцРНК, неспецифическую обратную транскрипцию с помощью специальных петлевых адаптеров и амплификацию полученных фрагментов кДНК.

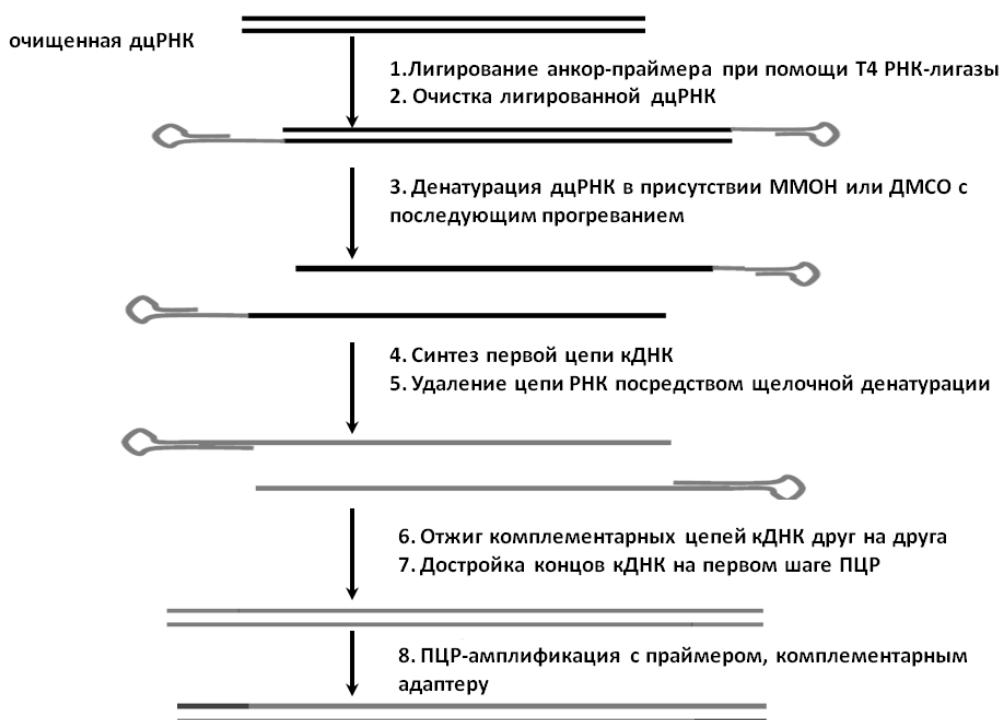


Рисунок 13. Схема метода неспецифической амплификации дцРНК

Методика пробоподготовки:

1. Для удаления остатков ДНК исходную РНК в объеме 9 мкл обрабатывали 2 ед. ДНКазы I (Fermentas, Latvia) с добавлением 1,2 мкл 10х реакционного буфера (Fermentas) при 37 °С в течение 30 минут.
2. Фермент инактивировали добавлением 25мМ ЭДТА (Fermentas) с последующей инкубацией смеси 10 мин при 65°С.
3. Полученный продукт очищали с помощью набора QIAmp MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) по протоколу производителя. Очищенную РНК элюировали в 10 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany).
4. Вирусную дцРНК отделяли от балластной оцРНК методом преципитации в 2М хлориде лития. Для этого к 5 мкл очищенной РНК после обработки ДНКазой I добавляли 20 мкл 8М хлорида лития, доводили объём до 80 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany) и инкубировали на льду в течение 16 часов.
5. Центрифугировали 30 мин при 13 000 об/мин.
6. Супернатант, содержащий дцРНК, отбирали и очищали с помощью набора QIAmp MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) по протоколу производителя. Очищенную РНК элюировали в 10 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany).
7. Для осуществления обратной транскрипции дцРНК производили лигирование петлевых адаптеров Reo-Sp-Loop – «анкор-праймеров» с помощью T4 РНК-лигазы.

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 мкл очищенной дцРНК, 25 пмоль адаптера Reo-Sp-Loop (5'p-GAC CTC TGA GGA TTC TAA AC_Sp9_T CCA GTT TAG AAT CC-3'), 2 мкл 10х реакционного буфера для T4 РНК-лигазы (Fermentas), 4 мкл 50% полиэтиленгликоля (PEG4000, Fermentas), 10 ед. T4-РНК-лигазы (Fermentas, Latvia). До необходимого объема смесь доводили свободной от РНК-аз водой RNase-free water (Qiagen, Germany).

8. Смесь инкубировали при 25°C в термошейкере при 400 об/мин. Затем продукт лигирования очищали с помощью набора QIAmp MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) по протоколу производителя, РНК элюировали в 10 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany).
9. Для проведения обратной транскрипции 5 мкл дцРНК с лигированными адаптерами при в присутствии 3 мкл ДМСО (Fermentas, Latvia) денатурировали под слоем минерального масла при 90°C в течение 2 мин. Затем пробы извлекали из термостата и быстро помещали в лёд. На льду под масло вносили по 12 мкл реакционной смеси, состоящей из 4 мкл 5x буфера для AMV-ревертазы (Fermentas, Latvia), 1 мкл 10mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific Inc.), 6 мкл H₂O RNase-free water (Qiagen, Germany). Реакцию проводили в термошейкере при 37°C 30 мин, перемешивая смесь при 580 об/мин. Далее добавляли ещё по 20 ед. AMV-ревертазы (Fermentas, Latvia) и продолжали инкубировать ещё 30 мин при 42°C.
10. Продукт обратной транскрипции очищали с помощью набора QIAmp MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) по протоколу производителя. Полученную первую цепь кДНК элюировали в 10 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany).
11. Достройку второй цепи кДНК и амплификацию полученных фрагментов проводили в одношаговом режиме с праймером pReo, комплементарным адаптеру (5'p-GTT TAG AAT CCT CAG AGG TC-3'). Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала 2 мкл кДНК, 10 пмоль праймера pReo, 2,5 мкл дНТФ 1,76 мМ (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), 10 мкл ПЦР-смесь-2 blue (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). До нужного объёма смесь доводили стерильной деионизированной водой (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Реакцию осуществляли с помощью ДНК-амплификатора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в следующем режиме: 95°C–3 мин; 95°C–20с, 72°C–15 мин (n=2); и далее 95°C–20с, 50°C–20с, 72°C–1 мин (n=45); 72°C–3 мин.

Полученный ПЦР-продукт очищали с помощью набора QIAmp MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) по протоколу производителя с элюцией в 15 мкл.

12. Качество полученных библиотек кДНК оценивали методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с использованием буфера 1x TAE и добавлением бромистого этидия (Рисунок 14). В качестве маркера длин на гель дополнительно наносили GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) с диапазоном длин 100 - 10 000 п.о.

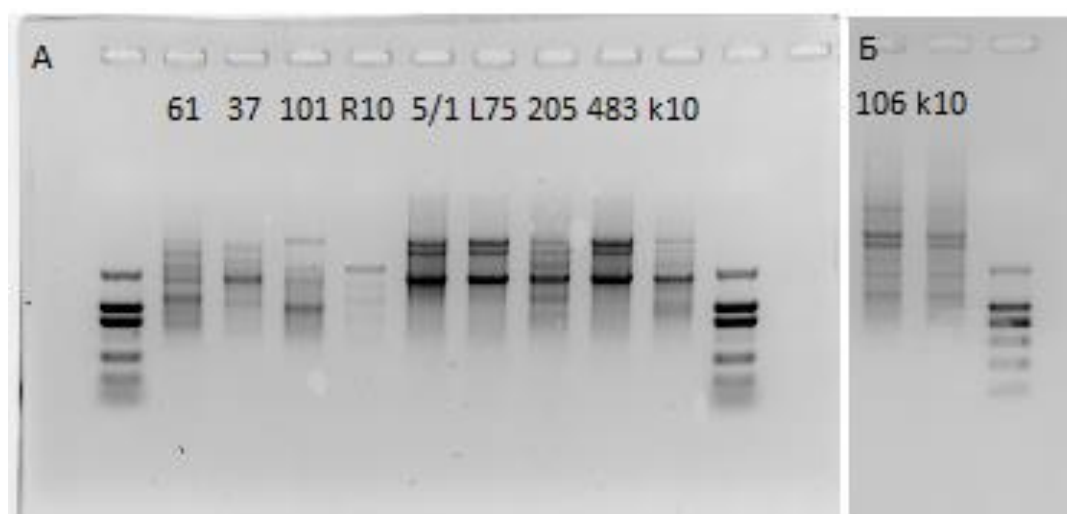


Рисунок 14. Электрофорез библиотек кДНК

Примечание:

А – KEMV 61, KEMV 37, KEMV 101, KEMV R10, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483, KEMV k10 выращенных в культуре клеток СПЭВ.

Б – библиотеки кДНК штаммов KEMV 106 и KEMV k10, выращенных в культуре клеток ВНК-21

Маркер длин: 100 п.н., 200 п.н., 300 п.н., 400 п.н., 500 п.н., 800 п.н.

3.2.4 Проведение полногеномного секвенирования

Для проведения высокопроизводительного секвенирования использовалась коммерческая платформа Illumina (Illumina Inc., USA), относящаяся к т.н. группе секвенаторов «второго поколения» и основанная на технологии секвенирования синтезом с применением мостиковой ПЦР (Ребриков, 2015).

1. Для подготовки библиотек для высокопроизводительного секвенирования применяли готовый набор реагентов Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc., USA).
2. Качество полученных библиотек оценивали капиллярным электрофорезом с использованием 2100 Electrophoresis Bioanalyser (Agilent Technologies Inc., USA). Оцениваемыми параметрами являлись распределение фрагментов по длине и представленность каждого типа фрагментов в пуле библиотеки.
3. Секвенирование осуществляли на секвенаторе MiSeq (Illumina Inc, USA) с использованием картриджа для длинных прочтений (до 500 п.н.).

3.2.5 Сборка геномов

По результатам высокопроизводительного секвенирования был получен массив данных в стандартном формате FASTAQ (Cock *et al.*, 2010), который подвергался предварительному анализу для группирования последовательностей по штаммам в соответствии с индексами, присвоенными индивидуальным библиотекам на этапе пробоподготовки. Данные секвенирования также фильтровались по качеству с использованием стандартного критерия Phred (Q) равного 30. В соответствии с этим значением Q для последующей обработки отбирались данные с вероятностью ошибки секвенирования не более 0,1% (Ewing *et al.*, 1998).

После предварительной обработки для каждого из исследуемых штаммов был получен набор из большого количества коротких (до 500 п.о.) прочтений (ридов), случайным образом перекрывающих геном вируса.

Риды картировали с помощью стандартных алгоритмов сборки (Li *et al.*, 2012) на референсный геном, в качестве которого была взята полногеномная последовательность штамма вируса Кемерово 21/10 (Gen Bank acc. nos. KC288130-KC288139). Таким образом, для каждого штамма по отдельным сегментам генома из массива перекрывающихся между собой коротких прочтений, были собраны непрерывные последовательности (контиги).

Индивидуальные контиги вновь картировали на референс-геном с помощью пакета программ DNASTar Lasergene SeqMan v.7.0.0 (DNASTAR, Inc., USA) и устанавливали окончательную геномную последовательность вируса, отдельно для каждого из десяти сегментов. На этом этапе оценивали наличие и местоположение недостающих фрагментов в последовательности, не прочитавшихся в ходе высокопроизводительного секвенирования. Их, а также требующие уточнения спорные позиции в последовательности амплифицировали с помощью специфических праймеров, индивидуально подобранных на требуемые участки генома, а так же с помощью панели праймеров, разработанной ранее (Дедков, 2016). ПЦР-продукт секвенировали на капиллярном автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3500 *xl* (Applied Biosystems, USA), по результатам которого полностью восстанавливали искомую последовательность сегмента генома.

3.3 *In silico* анализ

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей производили с помощью пакета программ MEGA версии 5.2 с применением алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004). С помощью этого же пакета программ осуществляли филогенетический анализ. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) с использованием параметрической модели GTR (General Time-Reversible model) и оценкой гамма-распределения вариации частот между сайтами и долей инвариантных сайтов в последовательности (Nei and Kumar, 2001; Tamura *et al.*, 2011)

При проведении филогенетического анализа были использованы последовательности геномов других представителей рода *Orbivirus*, указанные в Таблице 7.

Таблица 7. Полногеномные последовательности вирусов группы Грейт-Айленд, использующиеся для филогенетического анализа

№	Вирус	Акроним	Штамм	Gen Bank accession numbers
1	Kemerovo virus	KEMV	21/10	KC288130 – KC288139
2	Kemerovo virus	KEMV	EgAn-1169	HQ266591 – HQ266600
3	Great Island virus	GIV	CanAr 42	NC_014522 – NC_014531
4	Tribec virus	TRBV	Tr19	KJ010789 – KJ010797; KJ574045
5	Tribec virus	TRBV	Tr35	KJ010798 – KJ010806; KJ574044
6	Tribec virus	TRBV	-	HQ266581 – HQ266590
8	Muko virus	MUV	MUV-hay	LC158842 – LC158851
9	Muko virus	MUV	Ix7-S1	LC019131 – LC019140

Местоположение открытых рамок считывания на сегментах генома определяли с помощью программы Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen, USA).

Идентичность нуклеотидных последовательностей всех сегментов генома для представителей группы Грейт-Айленд, вычисляли с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench версии 3.6.5 (CLC bio, Danmark).

Проверку на вероятные рекомбинации осуществляли с помощью программного обеспечения Recombination Detection Program (RDP) 4 beta 80 методами, предусмотренными данным программным обеспечением (Martin *et al.*, 2015).

3.4 Определение концентрации вируса в культуральной жидкости методом ПЦР в реальном времени с использованием РНК-калибраторов

В ходе анализа данных секвенирования и сравнения геномных последовательностей разных штаммов вируса Кемерово возникла необходимость в проведении дополнительной серии экспериментов для установления способности штаммов эффективно размножаться в культурах клеток СПЭВ и ВНК-21.

Для эксперимента были отобраны 9 штаммов вируса Кемерово, для которых в рамках настоящего исследования были получены полногеномные последовательности: KEMV 37, KEMV 61, KEMV 101, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483, KEMV 106, KEMV k10.

Эксперимент состоял из нескольких этапов.

1. Нарращивание вируса в культурах клеток, регистрация ЦПД
2. Экстракция РНК из образцов
3. Приготовление РНК-калибраторов
4. Измерение концентрации РНК вируса Кемерово

Заражение культур клеток, накопление вируса и регистрация ЦПД производились на базе ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН» в лаборатории биологии арбовирусов и лаборатории биохимии заведующей лабораторией вирусологии полиомиелита и других энтеровирусных инфекций – референс-центра ВОЗ по надзору за полиомиелитом Козловской Л.И. Далее обеззараженные образцы передавались в лабораторию диагностики вирусных инфекций I-II группы патогенности ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, где дальнейшие этапы эксперимента выполнялись лично автором.

1. Нарращивание вируса в культурах клеток, регистрация ЦПД

Работа по заражению культур клеток проводилась стандартными вирусологическими методами в соответствии с требованиями безопасности при

работе с микроорганизмами II группы патогенности (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)»).

На данном этапе эксперимента были отобраны образцы исходной вирусодержащей культуральной жидкости до заражения и по окончании 48-часового периода наращивания вируса в CO₂-инкубаторе после регистрации наличия или отсутствия выраженной ЦПД.

Культуральная жидкость отбиралась в двух повторностях для каждого образца в объёме 100 мкл и помещалась в плотно закрывающиеся пробирки, содержащие 900 мкл TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Germany). TRI Reagent представляет собой однофазный раствор, содержащий гуанидинтиоцианат и фенол и эффективно осуществляющий лизис и обеззараживание биологического образца (Product description – TRI Reagent).

2. Экстракция РНК из образцов

Экстракция РНК производилась методом улучшенной фенол-хлороформной экстракции по-Хомчинскому с помощью набора реагентов RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, Germany) на колонках RNeasy Mini Spin. Исходный протокол был модифицирован с учётом того, что образцы уже находились в TRI Reagent, полностью аналогичному реактиву QIAzol Lysis Reagent, входящему в состав набора для экстракции. Поэтому процедуру экстракции начинали сразу с добавления к образцам 200 мкл хлороформа (RNeasy Lipid Tissue Handbook). Образцы РНК по окончании процедуры экстракции элюировали с колонок в 50 мкл свободной от РНК-аз воды RNase-free water (Qiagen, Germany).

Экстракция производилась в двух повторностях – из каждой пробы, отобранной в TRI Reagent.

3. Приготовление РНК-калибраторов

Для определения концентрации вирусной РНК в образцах в количестве копий на миллилитр готовили калибраторы, представляющие собой положительный контрольный образец РНК с известной концентрацией. В качестве рекомбинантного контрольного образца был взят

высококонцентрированный препарат, из которого производится приготовление РНК ПКО КЕМV, входящего в состав тест-системы для определения вируса Кемерово, разработанной для исследовательских целей (Дедков *с соавт.*, 2012).

Исходный препарат разводили методом предельных десятикратных разведений до 10^4 раз на свободной от РНК-аз воде RNase-free water (Qiagen, Germany).

Затем из образцов ПКО с разведением $10^1, 10^2$ и 10^4 раз производили экстракцию РНК с помощью набора «Рибо-ПРЕП» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) с элюцией РНК-содержащего осадка в 50 мкл РНК-буфера (ФБУН ЦНИИЭ, Россия).

Концентрацию полученной РНК определяли с помощью системы для определения концентрации рекомбинантных конструкций «CQS-gag» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) по стандартному протоколу.

Для получения готовых калибраторов РНК с известной концентрацией разводили на свободной от РНК-аз воде RNase-free water (Qiagen, Germany):

- Образец РНК ПКО КЕМV с разведением 10^1 раз разводили в 10 раз до получения РНК-калибратора «Cal 1» с концентрацией $1,2 \cdot 10^8$ копий/мл.

- - Образец РНК ПКО КЕМV с разведением 10^2 раз разводили в 100 и в 1000 раз до получения РНК-калибраторов «Cal 2» и «Cal 3» с концентрацией $2,3 \cdot 10^6$ и $2,3 \cdot 10^5$ копий/мл соответственно.

4. Измерение концентрации РНК вируса Кемерово методом ПЦР в реальном времени.

Концентрацию исследуемых образцов РНК определяли в постановке стандартной количественной ОТ-ПЦР с калибраторами.

Приготовление ПЦР-смеси-FL КЕМV и ферментно-буферной смеси для проведения обратной транскрипции и амплификация в режиме реального времени производились по схеме, предложенной (Дедков *с соавт.*, 2012). Наряду с исследуемыми образцами, положительными и отрицательными контролями, в постановку были включены калибраторы, приготовленные на предыдущем этапе эксперимента. Калибраторы тестировались в четырёх повторностях, каждый

образец культуральной жидкости в двух повторностях – по одному из каждой точки, взятой для экстракции вирусной РНК.

Постановка ОТ-ПЦР производилась на амплификаторе планшетного типа CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, USA). Построение калибровочной кривой и вычисление концентрации РНК осуществлялось автоматически программным обеспечением прибора BioRad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, USA). Для получения конечного значения концентрации РНК для каждого образца выводили среднее значение из двух повторностей.

3.5 Разработка критериев оценки эпидемического потенциала вирусов - возбудителей природно-очаговых инфекций

Согласно классификации, предложенной В.В. Шкариным, вирус Кемерово относится к «новым инфекциям, находящимся в «зале ожидания»» - т.е. Находящимся в стадии изучения, эпидемиологическую опасность которых ещё предстоит оценить (Шкарин, 2012), а значит, он также может быть отнесен к вирусам, для которых существует риск возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с группой малоизученных возбудителей (Bettencourt and Ribeiro, 2008), которые требуют разноплановой оценки с учётом многих характеристик возбудителя. Поэтому в настоящей работе была разработана система количественной оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной природы, поскольку они объединены общими закономерностями существования в рамках теорий природной очаговости (Павловский, 1939) и учения об эпидемическом процессе (Громашевский, 1965), и представляют наибольшую актуальность при рассмотрении проблемы новых инфекций, которая не ограничена исключительно трансмиссивными инфекциями. Поэтому чтобы разработанная система могла считаться универсальной, в неё были включены возбудители природно-очаговых инфекций, для которых трансмиссивный механизм передачи не реализуется.

Понятие эпидемического потенциала тесно связано с понятием эпидемиологической опасности, формирующей эпидемиологический риск и складывающейся из опасностей источника инфекции, механизма передачи и восприимчивости организма (Черкасский, 2007) в соответствии с классической триадой эпидемического процесса Громашевского (Громашевский, 1965) (Рисунок 15).



Рисунок 15. Составные элементы эпидемического процесса

На основании этого в рамках созданной системы количественной оценки эпидемического потенциала был определён ряд показателей, разделённых на три группы по опасности каждого из элементарных звеньев эпидемического процесса: опасность источника возбудителя инфекции, опасность механизма передачи и опасность восприимчивости макроорганизма. В рамках каждой группы обозначено по 4 показателя, в каждый из которых включены факторы, ранжированные по шкале от 1 до 5, в соответствии со значимостью с точки зрения реализации эпидемиологического риска (Таблица 8). Максимальное количество баллов, по которым может быть оценён возбудитель в каждой из трёх групп – 20, с учётом всех трёх вышеозначенных групп – 60. Эпидемический потенциал вируса оценивается при суммировании баллов по всем трём группам, соотношение баллов между группами позволяет оценить значимость того или иного элемента в развитии эпидемического процесса для данного возбудителя а, следовательно, ведущий фактор эпидемиологического риска.

1. Опасность источника возбудителя инфекции.

Источник возбудителя инфекции – первое звено эпидемического процесса, место естественной жизнедеятельности возбудителя. Согласно традиционным представлениям о природно-очаговых инфекциях, сюда необходимо относить всё, что касается природы животных-резервуаров инфекции, в популяции которых возбудитель циркулирует за счёт эпизоотий и носительства. Однако современные

представления в контексте изучения эпидемиологии новых и возвращающихся инфекций указывают на необходимость рассмотрения не только характеристик источника возбудителя, но также и самого возбудителя, участвующих в формировании и поддержании эпидемического процесса (Holmes *et al.*, 2018). В первую очередь, его потенциала генетической изменчивости и других факторов, способных модулировать вирулентность и способность адаптироваться к различным видам носителей и переносчиков. ЦИРИП

В эту группу были отнесены такие факторы, как тип генетического материала вируса, с которым непосредственно связаны темпы мутационной изменчивости, дополнительные источники генетической изменчивости в виде реассортации и рекомбинации, филогенетические взаимоотношения с близкородственными вирусами, патогенными для человека, а также характеристику природного резервуара возбудителя, от видового состава и разнообразия которого также напрямую зависит изменчивость вируса и риск инфицирования человека.

2. Опасность механизма передачи возбудителя

В данную группу факторов входят ведущий механизм передачи возбудителя, возможность передачи от человека к человеку, территориальная характеристика природного резервуара инфекции и особенности взаимодействия человека с ним. Тот или иной механизм передачи инфекции, как второе звено эпидемического процесса, реализуется посредством разнообразных факторов передачи. И, как и первая группа факторов, отчасти сопряжён с биологическими свойствами возбудителя, определяющими его способность сохраняться во внешней среде.

Характер взаимодействия человека, проживающего на эндемичной территории, с источником инфекции, также как и территориальная характеристика природного резервуара в определённой мере относятся к факторам, отражающим опасность первого звена эпидемического процесса, но при этом также характеризуют эпидемиологическую опасность реализации

механизма передачи инфекции, поэтому в существующей системе показателей данные факторы отнесены ко второму звену.

3. Опасность восприимчивости макроорганизма

Включает факторы, описывающие опасность третьего обязательного элемента эпидемического процесса, особенности течения инфекционного процесса при взаимодействии организма человека с возбудителем, которые способствуют проявлению и поддержанию патологического процесса на популяционном уровне.

В данную группу отнесены непосредственный круг восприимчивых организмов и факторы, характеризующие время существования возможного эпидемического очага и рис возникновения вторичных и третичных случаев заражения (обычная продолжительность инкубационного периода, характер течения инфекции), а также интенсивность распространения эпидемического процесса.

Таблица 8. Критерии оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной природы

Опасность источника инфекции		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
1	2	3
Тип генетического материала вируса	(+) РНК	5
	Сегментированная (-)РНК и дцРНК	4
	Несегментированная (-) РНК	3
	оцДНК	2
	дцДНК	1
Дополнительные источники генетической изменчивости	Показана способность к межвидовой реассортации и/или рекомбинации	5
	Показана способность к внутривидовой реассортации и/или рекомбинации	4
	Показана межвидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	3
	Показана внутривидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	2

1	2	3
	Наличие реассортационных и/или рекомбинационных явлений у любого близкородственного вируса	1
Филогенетические взаимоотношения вируса близкородственными представителями	Наличие в пределах рода возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	5
	Наличие в пределах рода представителей с доказанной патогенностью для человека	4
	Наличие в филогенетически близких родах возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	3
	Наличие в филогенетически близких родах представителей с доказанной патогенностью для человека	2
	Наличие в семействе патогенных представителей	1
Характеристика организмов-резервуаров инфекции	Полигостальность, включая птиц и рукокрылых	5
	Полигостальность, включая мелких млекопитающих, грызунов и диких хищников	4
	Полигостальность, включая КРС, МНС, свиней и диких копытных	3
	Моногостальность с повсеместным распространением	2
	Моногостальность с локальным распространением	1
Опасность механизма передачи		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
Ведущий механизм передачи	Аспирационный	5
	Фекально-оральный	4
	Трансмиссивный поливекторный	3
	Трансмиссивный моновекторный	2
	Контактный	1
Характер взаимодействия человека с природным резервуаром инфекции	Постоянное взаимодействие всех групп населения с эпизоотическим очагом	5
	Регулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	4
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом среди различных групп населения	3

1	2	3
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	2
	Случайное взаимодействие с эпизоотическим очагом	1
Территориальная характеристика природного резервуара	Множественные очаги в различных природно-климатических зонах	5
	Множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны	4
	Локальные очаги большой территориальной протяжённости	3
	Множественные очаги малой территориальной протяжённости	2
	Единичные очаги малой территориальной протяжённости	1
Возможность передачи от человека человеку	Формирует устойчивые антропоургические очаги за счёт передачи аспирационным или фекально-оральным путём	5
	Возможна аспирационная или фекально-оральная передача без формирования устойчивых антропоургических очагов	4
	Возможна контактная передача	3
	Возможна трансмиссивная передача	2
	Возможна вертикальная передача	1
Опасность восприимчивости макроорганизма		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
Восприимчивый организм	Доказана патогенность для человека	5
	Доказана патогенность для млекопитающих - различных видов тест-организмов.	4
	Патогенен для определённого вида тест-организмов или только при определённом способе заражения	3
	Патогенен для новорожденных мышей, вызывает ЦПД на клетках	2
	Наличие патогенных близкородственных представителей	1
Обычная продолжительность инкубационного периода	Более 3 недель	5
	До трёх недель	4
	До двух недель	3
	От 5 дней до недели	2
	Менее 5 дней	1

Продолжение таблицы 8

1	2	3
Характер течения инфекционного процесса	Неманифестное (бессимптомное)	5
	Манифестное лёгкое	4
	Манифестное средней тяжести	3
	Манифестное тяжёлое	2
	Манифестное тяжёлое с летальным исходом	1
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы случаи пандемической заболеваемости	5
	Зарегистрированы случаи эпидемической заболеваемости	4
	Зарегистрированы случаи вспышечной заболеваемости	3
	Зарегистрированы случаи спорадической заболеваемости	2
	Наличие серопревалентности при отсутствии заболеваемости	1

По результатам оценки возбудителя по предложенным факторам, по сумме баллов предлагается следующая шкала определения эпидемического потенциала:

6. При сумме баллов 24 и ниже – низкий эпидемический потенциал;
7. При сумме баллов от 25 до 44 – средний эпидемический потенциал;
8. При сумме баллов 45 и выше – высокий эпидемический потенциал.

Если в ходе балльной оценки для вируса подходит несколько факторов из перечисленных – оценка выставляется по максимальному значению. Если данные по какому-либо фактору отсутствуют или в настоящий момент никак не изучены – ставится 0.

4. Результаты и обсуждения

4.1 Получение геномных последовательностей штаммов вируса Кемерово

На первом этапе были секвенированы и аннотированы полные геномы 9 штаммов вируса Кемерово: KEMV 61, KEMV k37, KEMV 101, KEMV 5/10, KEMV 106, KEMV k10, KEMV k37, KEMV 61, KEMV 483. Получить полногеномную последовательность для штамма KEMV R10 не удалось. Для него были секвенированы и охарактеризованы последовательности 2-х геномных сегментов: сегмента 1, кодирующего последовательность белков VP1 (РНК-зависимая РНК-полимераза), и сегмента 2, кодирующего последовательность субкорового белка VP3.

Все полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных Gen Bank (Таблица 8).

Для проведения сравнительного описания геномов в работе использовались также имеющиеся в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности других представителей группы Грейт-Айленд (Таблица 9)

Таблица 9. Характеристика известных геномных последовательностей вирусов группы Грейт-Айленд и номера доступа в базе данных Genbank

№	Вирус, штамм	Источник изоляции	Регион	Год изоляции	Номер доступа в Genbank
1	2	3	4	5	6
1	KEMV 61	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	1973	MF939485 – MF939494
2	KEMV 37	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	7973	MF939545 – MF939554
3	KEMV 101	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1970	MF939495 – MF939504
4	KEMV R10	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1962	MF939565 – MF939566
5	KEMV 5/1	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1969	MF939475 – MF939484
6	KEMV L75	Человек	РФ, Кемеровская область	1962	MF939555 – MF939564

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
7	KEMV 205	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Вологодская область	1974	MF939515 – MF939524
8	KEMV 483	<i>I. ricinus</i>	РФ, Вологодская область	1975	MF939525 – MF939534
9	KEMV 106	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	1973	MF939505 – MF939514
10	KEMV k10	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1966	MF939535 – MF939544
11	KEMV 21/10	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1968	KC288130 – KC288139
12	KEMV EgAn 1169	<i>Ornitodoros sp.</i>	Египет	1961	HQ266591 – HQ266600
13	GIV CanAr 42	<i>I. uriae</i>	Ньюфаундленд, Канада.	1971	NC_014522 – NC_014531
14	TRBV Tr19	<i>I. ricinus</i>	Украина, Одесская область	2008	KJ010789 – KJ010797; KJ574045
15	TRBV Tr35	<i>I. ricinus</i>	Украина, Одесская область	1988	KJ010798 – KJ010806; KJ574044
16	TRBV ref	<i>I. ricinus</i>	Словакия	1963	HQ266581 – HQ266590
17	LIPV CzArLip_91	<i>I. ricinus</i>	Словакия	1963	NM543475 – NM543477
18	MUV MUV-hay	<i>I. turdus</i>	Япония	2015	LC158842 – LC158851
19	MUV Ix7-S1	<i>I. turdus</i>	Япония	2010	LC019131 – LC019140

4.2 Сравнительное описание геномов штаммов вируса Кемерово

Длины сегментов генома совпадают у всех изученных штаммов вируса Кемерово. Исключения в виде сегмента 5 у штаммов KEMV 61, KEMV k10, сегмента 6 у штамма KEMV EgAn-6169 и сегмента 7 у штамма 5/1 KEMV носят характер случайных замен в некодирующей части, и не влияют на положение и длину открытой рамки считывания. G+C состав различных сегментов генома вируса Кемерово варьирует от 55 до 59%, и, как правило, посегментно остаётся постоянным для всех штаммов KEMV. Разброс в значении G+C состава сегментов

между штаммами составляет не более 1%, только в сегменте 4 достигает 2% (Приложение 1).

Все это, несомненно, свидетельствует о принадлежности изучаемых штаммов к вирусу Кемерово и о тесном родстве с другими представителями группы Грейт-Айленд. Близкое родство при сравнении сегментов генома также обнаруживают вирусы Трибеч и Муко, на что ранее указывалось исследователями, описавшими штаммы MUV и давшими их первую молекулярно-генетическую характеристику (Ejiri *et al.*, 2015).

Все исследуемые штаммы вируса Кемерово имеют сходную структуру консервативных терминальных участков сегментов генома (Приложение 2). Тем не менее, она существенно отличается от консенсусов, принятых для представителей группы Грейт-Айленд, что подтверждает обособленное положение вируса в группе.

Вычислен процент нуклеотидной идентичности для сегментов генома штаммов вируса Кемерово (Таблица 10). Для всех сегментов, за исключением четвертого, значения нуклеотидной идентичности между штаммами находятся в диапазоне от 99,77% до 90,12%. Самым варибельным сегментом является четвертый сегмент, кодирующий белок наружного слоя капсида (VP2) вирусной частицы. Диапазон значений нуклеотидной идентичности для него составляет от 99,77 % до 88,61%. Данный белок определяет её антигенные свойства и вирулентность (Belaganahalli *et al.*, 2015), поэтому существующие различия в нуклеотидной структуре сегмента позволяют предположить наличие у разных штаммов вируса Кемерово отличительных особенностей взаимодействия с клеткой-хозяином. Самыми консервативными являются сегменты, кодирующие неструктурный белок NS1 и структурные белки VP3(T2) и VP5, формирующие соответственно субкорковый и наружный слой капсида (Belaganahalli *et al.*, 2015).

Таблица 10. Нуклеотидная идентичность сегментов генома вируса Кемерово*

№ сегмента	Белок	Функция	Диапазон значений нуклеотидной идентичности, %
1	VP1 (Pol)	РНК-зависимая РНК-полимераза	99,69 – 94,61
2	VP3 (T2)	Формирует субкорковый слой капсида	99,53 – 94,91
3	VP4 (Cap)	Кэпирующий фермент	99,59 – 90,12
4	VP 2	Формирует внешний слой частицы, обеспечивает проникновение вируса в клетку-хозяина, является серотип специфическим антигеном	99,77 – 88,61
5	NS1 (TuP)	Неструктурный белок, формирует тубулярные структуры в цитоплазме клетки-хозяина	99,36 – 95,76
6	VP5	Формирует наружный капсид	99,58 – 95,14
7	NS2 (ViP)	Неструктурный белок, формирует вирусные тельца включения	99,67 – 92,57
8	VP7 (T13)	Формирует внешний коровый слой	99,41 – 92,81
9	VP6 (Hel)	Хеликаза	99,33 – 92,47
10	NS3	Неструктурные белки, участвующие в освобождении вирусных частиц из клетки-хозяина	99,58 – 92,64

*Примечание: Соответствие сегментов генома КЕМV и кодируемых ими вирусных белков и их функций приведены согласно данным (Belaganahalli *et al.*, 2015).

Произведён анализ нуклеотидной идентичности штаммов вируса Кемерово и других представителей группы Грейт-Айленд по двум сегментам генома: первому, кодирующему РНК-зависимую РНК-полимеразу VP1 (Приложение 3) и второму, кодирующему основной субкорковый структурный белок VP3 (T2) (Приложение 4).

По результатам сравнения идентичности нуклеотидных последовательностей по первому сегменту (Приложение 3), штаммы вируса Кемерово имеют от 94,61 до 99,69% сходства друг с другом и от 94,71 до 95,59%

сходства по отношению к референсному штамму EgAn-1169. Штаммы вируса Трибеч показывают от 88,87 до 95,27% нуклеотидной идентичности друг с другом, от 69,08 до 70,13% нуклеотидной идентичности со штаммами вируса Кемерово и от 88,31 до 95,30% нуклеотидной идентичности с вирусом Липовник. Идентичность вирусов Муко и Трибеч по первому сегменту составляет от 81,55 до 82,73%.

По результатам сравнения идентичности нуклеотидных последовательностей по второму сегменту (Приложение 4), все штаммы вируса Кемерово продемонстрировали от 94,91 до 99,53% сходства друг с другом и от 95,74 до 99,32% сходства по отношению к референсному штамму EgAn-1169. Штаммы вируса Трибеч показывают от 93,20 до 98,62% нуклеотидной идентичности друг с другом, от 74,39 до 76,44% нуклеотидной идентичности со штаммами вируса Кемерово и от 91,69 до 93,09% нуклеотидной идентичности с вирусом Липовник. Нуклеотидная идентичность вирусов Муко и Трибеч по указанному сегменту составляет от 81,78 до 83,06%.

4.3 Филогенетический анализ группы вирусов Грейт-Айленд

Произведена филогенетическая реконструкция нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов вируса Кемерово по всем десяти сегментам (Рисунок 16). Из анализа был исключён штамм KEMV R10, поскольку он секвенирован лишь частично. Для проведения анализа использовались последовательности геномов других представителей группы Грейт-Айленд, для которых имеются полногеномные последовательности (Таблица 8). Филогенетические деревья укоренены на геном вируса Грейт-Айленд.

Филогенетическая реконструкция подтвердила, что вирус Кемерово формирует отдельную ветвь в пределах группы Грейт-Айленд, отличную от ветви, формируемой штаммами вируса Трибеч, в которую помимо собственно вируса Трибеч входит также вирус Муко.

Для филогенетических деревьев, построенных по всем десяти сегментам, наблюдается изменение топологии клад, образуемых штаммами вируса Кемерово, что свидетельствует о наличии явления множественной межсегментной реассортации. Для вируса Кемерово данное явление показано впервые.

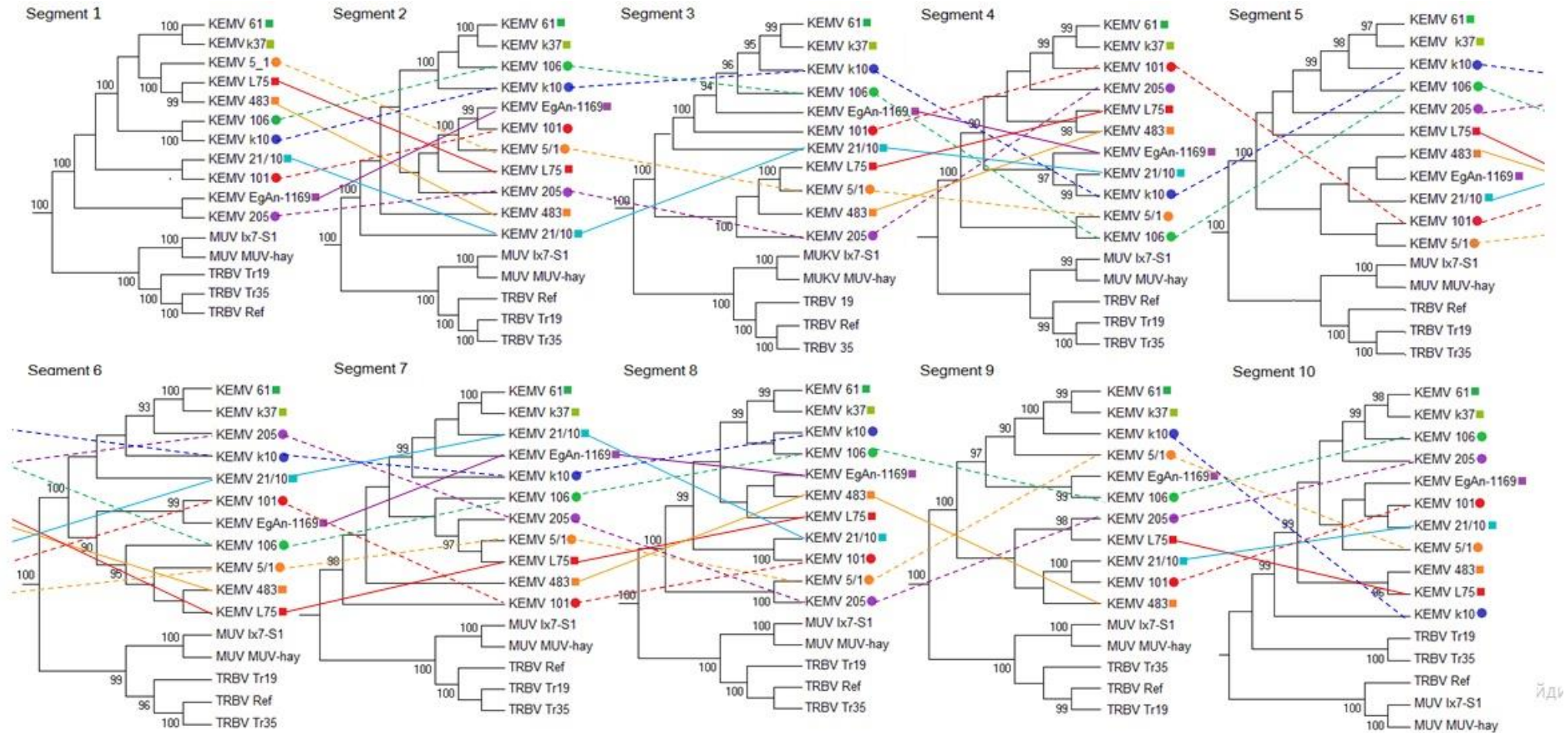


Рисунок 16. Филогенетическое дерево вирусов группы Грейт-Айленд, построенное на основании нуклеотидных последовательностей.

Примечание: Филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) с использованием параметрической модели GTR (General Time-Reversible model) и оценкой гамма-распределения вариации частот между сайтами и долей инвариантных сайтов в последовательности с помощью ПО МЕГА версии 5.2. Деревья укоренены по геному вируса Грейт-Айленд (GIV, штамм CanAr 42; NC_014522 – NC_014531) (на рисунке не представлен). Достоверность топологии филогенетического дерева оценена с помощью 1000 бутстреп повторов.

Положение штаммов вируса Кемерово на филогенетических деревьях отмечено точками, изменение местоположения обозначено сплошными и пунктирными линиями.

Ранее межсегментная реассортация в группе вирусов Грейт-Айленд была описана для вируса Трибеч (Dedkov *et al.*, 2014a). Данное явление также наблюдается на построенных филогенетических деревьях, но при этом изменение топологии клад затрагивает не только вирус Трибеч, но и вирус Муко. В сегменте 10 референсный штамм вируса Трибеч (TRBV ref) перемещается в кладу, образуемую вирусами Муко (Рисунок 17), что, несомненно, указывает на реассортацию. Родство вирусов Муко и Трибеч было описано ранее (Ejiri *et al.*, 2015), но обнаружение реассортации у данных вирусов является одним из важнейших критериев, указывающих на их принадлежность к одному виду.

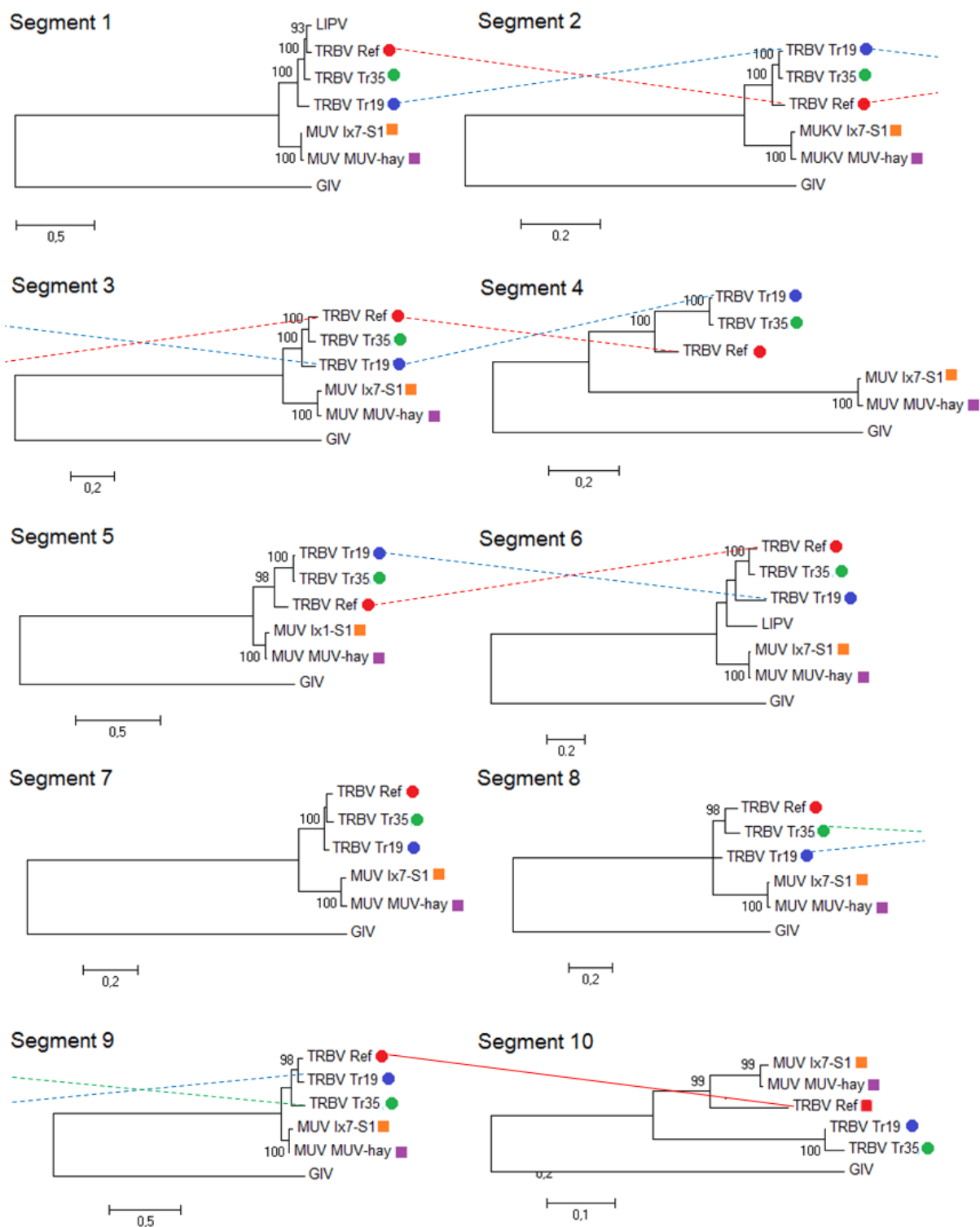


Рисунок 17. Филогенетическое дерево вирусов Трибеч (TRBV) и Муко (MUV), построенное на основании нуклеотидных последовательностей.

Примечание: Филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) с использованием параметрической модели GTR (General Time-Reversible model) и оценкой гамма-распределения вариации частот между сайтами и долей инвариантных сайтов в последовательности с помощью ПО МЕГА версии 5.2. Деревья

укоренены по геному вируса Грейт-Айленд (GIV, штамм CanAr 42; NC_014522 – NC_014531). Достоверность топологии филогенетического дерева оценена с помощью 1000 бутстреп повторов.

Положение штаммов вируса Трибеч и Муко на филогенетических деревьях отмечено точками, реассортация между штаммами вируса Трибеч обозначена пунктирными линиями, реассортация между штаммом вируса Трибеч TRBV Ref и вирусом Муко обозначена сплошной линией.

Межсегментной реассортации между вирусами Кемерово и Трибеч не зарегистрировано, однако, наблюдаемые в настоящем исследовании реассортационные явления позволяют предположить возможность обмена сегментами генома и для этих представителей группы Грейт-Айленд.

Интересна филогенетическая позиция штамма EgAn-1169, выделенного из аргасового клеща на территории Египта в 1961 году. Реконструкция положения данного штамма на филогенетическом древе внутри клады KEMV указывает на его связь со штаммами KEMV 205, KEMV 101, KEMV106, KEMV K10, KEMV 21/10 и KEMV483, полученными из клещей *I.persulcatus* и *I. ricinus* на территории Кемеровской, Вологодской областей и Алтайского края в 70-х годах прошлого века, что может свидетельствовать об общности их происхождения. Это позволяет предположить, что штамм EgAn-1169 мог быть занесён на территорию Египта из Западной Сибири в ходе миграции мелких воробьинообразных, поскольку пути перелета этих птиц проходят по данным территориям (Юдин, 2002; Рябицев, 2008).

Штамм KEMV L75 – единственный сохранившийся штамм, выделенный в Кемеровской области от больного человека с симптомами энцефалита в 1962 г., оказывается филогенетически наиболее близок штаммам KEMV R10 и KEMV 5/1, полученным из клещей *I.persulcatus* на территории Кемеровской области в 1962 и 1965 годах соответственно, а также к штаммам KEMV 483 и KEMV 205, полученным в 1974-1975 годах на территории Алтайского края из клещей *I.ricinus* и *I.persulcatus*. В сегменте 8, в результате реассортации, штамм KEMV L75 оказывается наиболее близок к кладе, образуемой штаммами KEMV EgAn-1169 и KEMV 483.

Таким образом, в рамках настоящего исследования впервые достоверно показана множественная межсегментная реассортация для вируса Кемерово, а также ранее неописанное явление межвидовой сегментной реассортации в группе Грейт-Айленд, между вирусами Трибеч и Муко. Способность обмениваться сегментами генома свойственна РНК-содержащим вирусам и является для них одним из важнейших источников генетической изменчивости. Вследствии этого формируется столь тесная взаимосвязь, продемонстрированная в ходе филогенетической реконструкции штаммами, выделенными в различные годы на различных территориях и из разных источников. Это наделяет изучаемые вирусы высоким потенциалом генетической изменчивости, который может приводить к возникновению штаммов с новыми неизвестными свойствами, в том числе высокопатогенных для млекопитающих и человека.

Несмотря на широкую распространённость вируса Кемерово на территории Российской Федерации и значительную превалентность в популяциях переносчиков, в настоящее время заболеваемость вирусом Кемерово официально не регистрируется и современные данные о его патогенности для человека отсутствуют. В связи с этим можно предположить, что способность вируса Кемерово вызывать менингоэнцефалит и лихорадочные состояния была утрачена в результате процессов реассортации. Однако свойственная вирусу Кемерово способность к изменчивости в будущем может привести к возникновению иных реассортантных форм, к возврату или усилению его патогенных свойств. Это делает вирус Кемерово потенциально опасным с точки зрения эпидемиологического благополучия населения, проживающего на эндемичных по вирусу Кемерово территориях.

Следует отметить, что реассортация требует ко-репликации двух штаммов в одном организме хозяина или переносчика, следовательно, данное явление не является редкостью для представителей группы Грейт-Айленд. Кроме того, многие штаммы-реассортанты происходят из географически удалённых друг от друга регионов. В случае с вирусами Трибеч и Муко, регионы циркуляции вирусов разделены протяжённостью практически целого континента. Очевидно,

что в данных условиях реассортация не может поддерживаться исключительно за счёт поливекторности и полигостальности возбудителей, а требует наличия механизмов транслокации, позволяющих вирусам перемещаться на огромные расстояния.

Явлений рекомбинации в ходе исследования полученных геномных последовательностей обнаружено не было, однако это может быть связано с ограниченным числом исследованной выборки, которая не отражает состояния популяции возбудителя, а фактически представляет собой одномоментный срез с ограниченной степенью информативности. Способность обмениваться участками сегментов генома свойственна орбивирусам, например, вирусу синего языка овец (He *et al.*, 2010), и наряду с межсегментной реассортацией может являться источником генетической изменчивости вируса.

4.4 Альтернативные рамки считывания в сегменте 9 вируса Кемерово и их предполагаемое влияние на патогенность вируса

Особый интерес у вируса Кемерово представляет сегмент 9, кодирующий структурный белок VP6, представляющий собой фермент хеликазу. В данном сегменте для вируса Кемерово описано существование альтернативных рамок считывания VP6а, с которых может синтезироваться белок меньшей массы, по сравнению с основным.

Альтернативную рамку считывания VP6а в сегменте 9 имеют все изучаемые в рамках настоящего исследования штаммы вируса Кемерово. Референсный штамм KEMV EgAn-1169 имеет две короткие альтернативные рамки считывания ORFa и ORFb протяжённостью 102 п.о. и 453 п.о. соответственно. Штаммы KEMV 21/10, KEMV 61, KEMV k37, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483 имеют одну протяжённую альтернативную рамку считывания VP6а величиной 582 п.о. У штамма KEMV 101 альтернативная рамка считывания на 33 п.о. длиннее и составляет 615 п.о. Штаммы KEMV 106, KEMV k10 также обладают одной альтернативной рамкой VP6а, но более короткой. У штамма

КЕМV 106 VP6a составляет 306 п.о. и терминируется «янтарным» стоп-кодоном (amber stop codon) TAG, у штамма КЕМVk10 VP6a составляет 333 п.о. и терминируется «опаловым» стоп-кодоном (opal stop codon) TGA (Рисунок 18). Следует отметить, мутации, приведшие к возникновению стоп-кодонов в альтернативной ОРС VP6a у штаммов КЕМV 106 и КЕМV k10 возникли независимо, о чём свидетельствует различная протяжённость альтернативной ОРС и разные терминирующие кодоны.

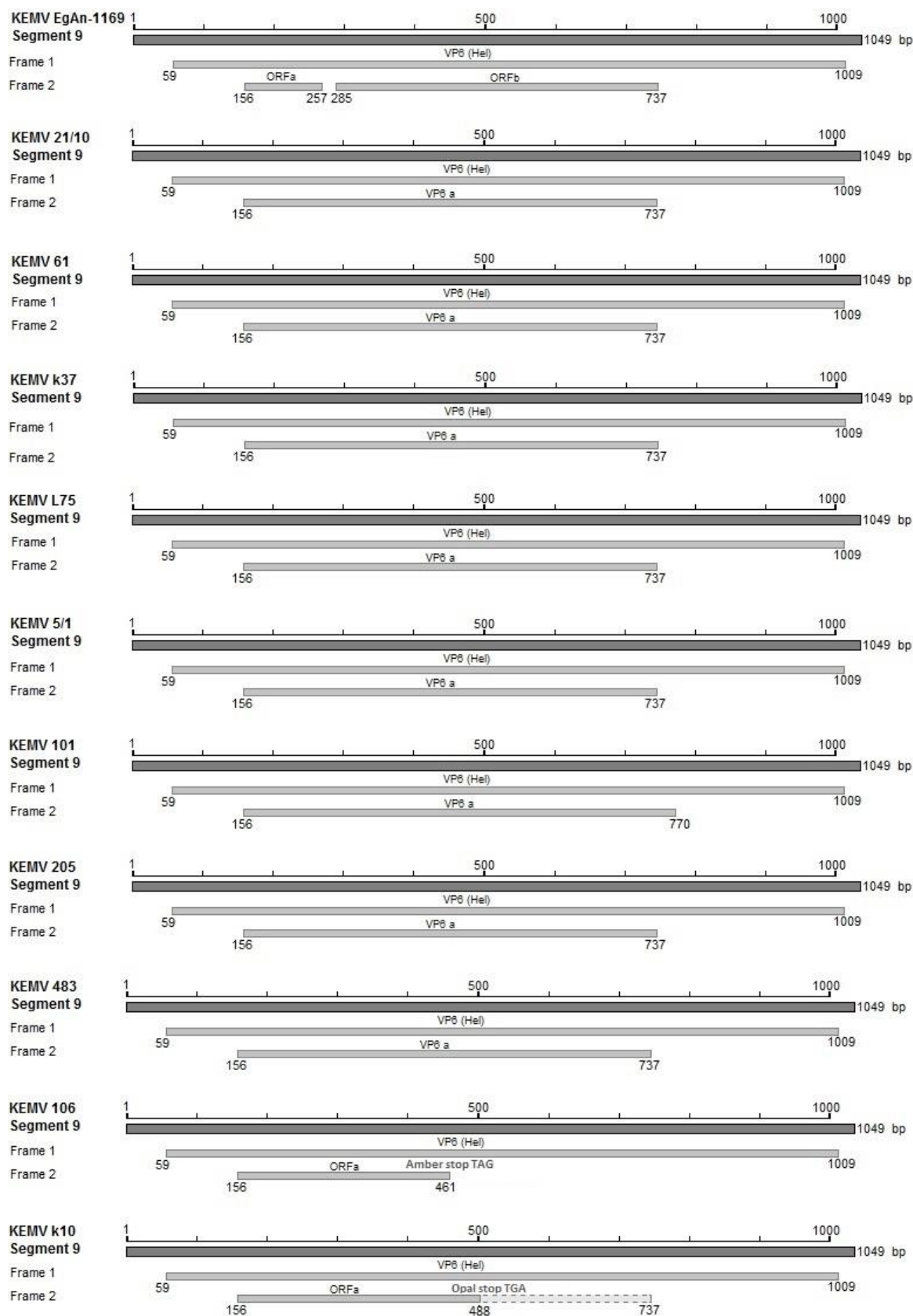


Рисунок 18. Карта сегмента 9 генома для штаммов вируса Кемерово с обозначением местоположения альтернативных рамок считывания VP6a, по данным программы Vector NTI 11.0

Аминокислотный состав белка фрагмента, кодируемого VP6a, у различных штаммов неодинаков (Рисунок 19). У штаммов KEMV 61, KEMV k37, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205, KEMV 483, KEMV 21/10 последовательность белка состоит из 194 аминокислот, имеет на своём протяжении 25 участков, содержащих замены. У штамма KEMV 101 последовательность длиннее и составляет 205 аминокислот.

	1	20	40	60	80
KEMV 21/10 VP6a	MRTI MHPYRRQI LQRI TNGR	NGNLEFVRQLDRPGQRWIEE	QREMLNVRGKNRRRMVLELT	FAIRRVEATLPQEILATGAE	
KEMV 5/1 VP6a	. . . T . . . F D Q
KEMV 61 VP6a	. . A T . . . F D Q G
KEMV 101 VP6a	. . . T D
KEMV 205 VP6a	. . . T D
KEMV 483 VP6a	. . A T D
KEMV k37 VP6a	. . A T . . . F D Q
KEMV L75 VP6a	. . . T D
	81	100	120	140	160
KEMV 21/10 VP6a	LLVQSRTVPNETVEV LARLR	NRWKVQHTVMI WHAKVKRAG	LGEFLLLPRDYARLCAAEDM	QIYRSMGLIAFFRIEIASYR	
KEMV 5/1 VP6a K . . . S . . . V I P C
KEMV 61 VP6a K . . . S . . . V I C
KEMV 101 VP6a L
KEMV 205 VP6a T . S I
KEMV 483 VP6a G . . . T . S I P
KEMV k37 VP6a K . . . S . . . V I C
KEMV L75 VP6a M . S I R
	161	180	200		
KEMV 21/10 VP6a	LLPRLRLNSDYARMRELRK	TRSLDSEGRRCVVQ	- - - - -	- - - - -	- - - - -
KEMV 5/1 VP6a	. P K S . . . V	M
KEMV 61 VP6a K S . . . V P	M Q
KEMV 101 VP6a Q K S I G S I A Y N G
KEMV 205 VP6a K G
KEMV 483 VP6a N
KEMV k37 VP6a K S . . . V	M Q
KEMV L75 VP6a K N G

Рисунок 19. Выравнивание аминокислотных последовательностей штаммов вируса Кемерово, транслируемых в сегменте 9 с альтернативной рамки считывания VP6a.

При исследовании альтернативных ОРС в сегменте 9 для изучаемых штаммов вируса Кемерово был проведён глубокий анализ результатов высокопроизводительного секвенирования, который выявил гетерогенность штамма KEMV k10 (Таблица 11). При оценке альтернативных нуклеотидных последовательностей в качестве референса была определена последовательность штамма KEMV k10, собранная при первоначальном анализе контигов, полученных в ходе высокопроизводительного секвенирования, и депонированная в GenBank (MF939535 – MF939544). При этом было обнаружено 18 SNV и одна инсерция, которые достоверно не являются результатом перекрёстной контаминации РНК другого штамма, и затрагивают все сегменты генома, кроме сегмента 4. 11 SNV при трансляции приводят к несинонимичным заменам в аминокислотном составе белков, 6 SNV являются синонимичными, 1 SNV располагается в некодирующей части, инсерция приводит к сдвигу ОРС в сегменте 2. Все замены представлены с различной частотой и не позволяют говорить о конкретном составе вирусных популяций штамма KEMV k10.

Интерес представляет SNV в 491 нуклеотиде сегмента 9. Для основной ОРС VP6 это – несинонимичная замена, но в альтернативной ОРС она приводит к замене стоп-кодона, терминирующего VP6а, аминокислотой и трансляции полноценной аминокислотной последовательности. Таким образом, для штамма KEMV k10 одновременно существуют как минимум 2 клона, отличающихся по конфигурации альтернативной рамки считывания в сегменте 9.

Таблица 11. Гетерогенность в геноме штамма KEMV k10 (MF939535 – MF939544)

Сегмент	Позиция нуклеотида	Референсный нуклеотид	Альтернативный нуклеотид	Всего ридов	Референсных ридов	Альтернативных ридов	Референсная аминокислота	Альтернативная аминокислота	% референсных ридов	% альтернативных ридов	Примечание
1	557	G	A	1316	1133	183	V	I	86.09%	13.91%	Несинонимичная замена
	2709	C	A	51	33	18	A	E	64.71%	35.29%	Несинонимичная замена
2	60	G	A	1531	1358	173	E	E	88.7%	11.3%	Синонимичная замена
	1737	C	CA	327	228	99	L	L	69.72%	30.28%	Синонимичная замена; Сдвиг ОРС
	1740	C	G	555	253	302	D	E	45.59%	54.41%	Несинонимичная замена
3	92	A	G	4313	3715	598	K	K	86.13%	13.87%	Синонимичная замена
5	101	T	C	2668	1812	856	I	I	67.92%	32.08%	Синонимичная замена
	1692	T	C	2433	2148	285	-	-	88.29%	11.71%	Некодирующий регион
6	379	C	T	4714	1364	3350	I	I	28.94%	71.06%	Синонимичная замена
	542	G	A	3319	2554	765	E	K	76.95%	23.05%	Несинонимичная замена
	1513	A	G	2964	2623	341	Q	Q	88.5%	11.5%	Синонимичная замена
7	736	C	A	2143	1908	235	R	R	89.03%	10.97%	Синонимичная замена
8	340	T	C	1291	908	383	C	R	70.33%	29.67%	Несинонимичная замена
	851	G	A	2836	2522	314	G	D	88.93%	11.07%	Несинонимичная замена
	908	A	G	2374	1444	930	H	R	60.83%	39.17%	Несинонимичная замена
9	297	T	C	3513	2731	782	W	R	77.74%	22.26%	Несинонимичная замена
	491	A	G	879	473	406	Opal stop codon	W	53.81%	46.19%	Прочитываемый опаловый стоп-кодон
	522	G	A	890	657	233	D	N	73.82%	26.18%	Несинонимичная замена
10	100	A	G	3841	2934	907	S	G	76.39%	23.61%	Несинонимичная замена

53,8% ридов сегмента 9 имеют опаловый стоп-кодон TGA в нуклеотидной позиции 489–491, тогда как у 46.1% ридов сегмента аденозин в положении 491 п.о. заменяется на тимидин. В результате происходит замена стоп-кодона триптофаном, что приводит к формированию длинной альтернативной ОРС. Таким образом, в штамме KEMV k10 наряду с клонами, имеющими короткую альтернативную ОРС VP6a, значительная часть вирусной популяции имеет полноценную VP6a протяжённостью 582 п.о.

Альтернативные рамки считывания в сегменте 9 были описаны и у других представителей генетической группы GIV (Belhouchet *et al.*, 2010), но их функция еще не до конца понятна. Высказана гипотеза о роли альтернативных ОРС у вируса Кемерово в определении клеточного тропизма и патогенности по отношению к млекопитающим (Attoui, 2009). На этом основании, стоп-кодона в альтернативной ОРС VP6a у штаммов KEMV 106 и KEMV k10, предполагающие одновременное существование двух разных типов VP6a в РНК популяции каждого из штаммов, также позволяют предположить, что синтезируемый с ОРС VP6a белок играет роль динамического переключателя, контролирующего свойства репликации вируса. Подобное явление, когда «опаловый» стоп-кодон (TGA) в сегментах, кодирующих регуляторные белки, может прочитываться как смысловой и тем самым влиять на их экспрессию, уже было описано для реовирусов (Naphthine *et al.*, 2012). Механизм этой адаптации не ясен, но стоп-кодон не обязательно подразумевает прекращение трансляции. В результате даже клоны KEMV k10 с опаловым стоп-кодом TGA в альтернативной ОРС VP6a теоретически могут продуцировать полноразмерный белок VP6a. Следует отметить, что подобная модуляция вирулентности с помощью считывающихся и появляющихся/исчезающих стоп-кодонов не редка для РНК-содержащих вирусов. Например, она достоверно известна для вирусов леса Семлики и О'Ньонг-Ньонг (род Alphavirus) (Lancotti *et al.*, 1998; Tuittila *et al.*, 2000). Кроме того, «опаловый» стоп-кодон в регуляторных белках вируса О'Ньонг-Ньонг может заменяться аминокислотой в течение нескольких пассажей в различных клеточных культурах (Lancotti *et al.*, 1998).

В рамках данной работы была обнаружена корреляция с клеточными линиями, в которых производилось наращивание вируса. Штаммы KEMV 106 и KEMV k10, имеющие короткие альтернативные рамки считывания, размножались в культуре клеток почки сирийского хомячка ВНК-21. Исследуемые штаммы KEMV k37, KEMV 61, KEMV 101, KEMV 5/1, KEMV L75, KEMV 205 и KEMV 483 и ранее описанный штамм KEMV 21/10, имеющие одну протяжённую альтернативную рамку считывания VP6a, размножались в культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Референсный штамм KEMV EgAn-1169, формирующий две короткие альтернативные рамки считывания ORF a и ORF b, отличные от рамок, образующихся у штаммов KEMV 106 и KEMV k10, наращивался в клетках почки зелёной мартышки Vero E6 (Belhouchet *et al.*, 2010). Чтобы проверить, является ли данная корреляция достоверной, отражающей роль альтернативных ОРС в сегменте 9 в определении цитопатических свойств вируса Кемерово, был проведён эксперимент по заражению двух видов перевиваемых культур клеток вирусосодержащими суспензиями полностью секвенированных в данной работе штаммов с последующей оценкой цитопатического эффекта.

Для этого вирусом из исходных замороженных культуральных суспензий инокулировали монослой культур клеток ВНК-21 и СПЭВ и выращивали в течение 48 часов при 37° С. В ходе и по окончании периода инкубации ЦПД оценивали визуально. Эффективность репликации вируса определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени с РНК-калибраторами (модификация метода, описанного Дедков *с соавт.*, 2012).

Визуальная оценка ЦПД по окончании 24-и 48-часового периода инкубации не показала выраженных отличий между штаммами на разных культурах клеток. Сравнение концентрации вирусной РНК перед инокуляцией и после 48-часового цикла размножения также не выявило никакой связи между эффективностью репликации штаммов вируса Кемерово в клеточных культурах и конфигурацией альтернативной ОРС VP6a (Рисунок 20). Гетерогенность популяции штамма KEMV k10 также не показала корреляции с его репликационными свойствами в различных культурах клеток.

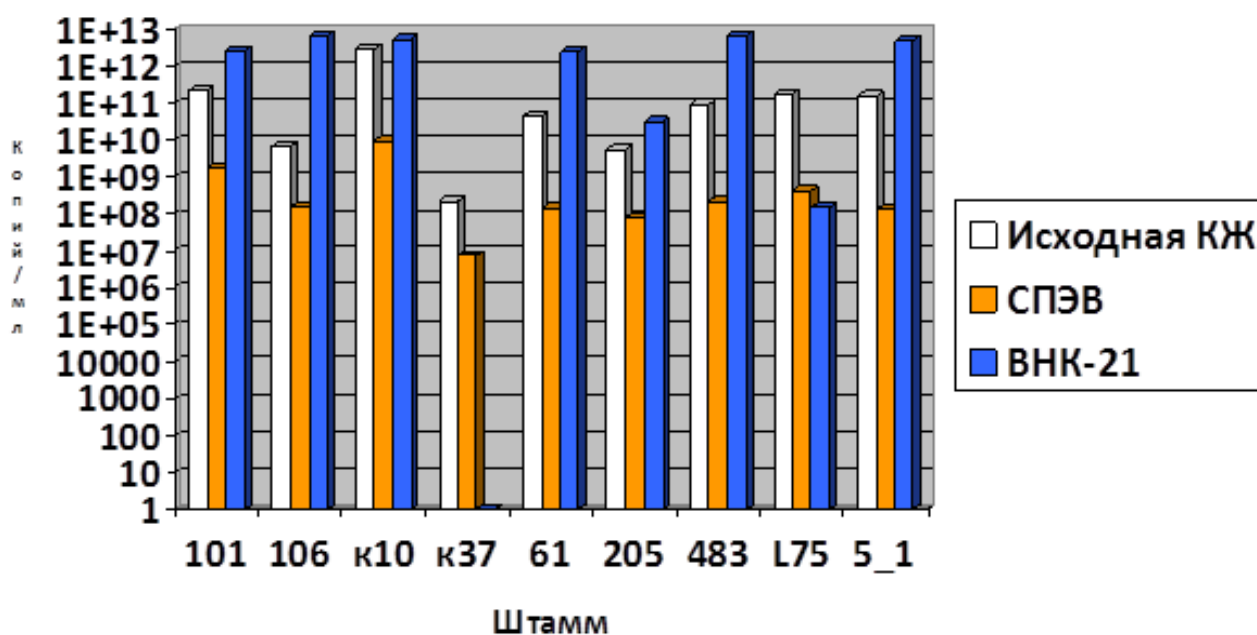


Рисунок 20. Концентрации вирусной РНК перед инокуляцией и после 48-часового цикла размножения на клетках СПЭВ и ВНК-21.

Таким образом, в рамках настоящей работы предположение о роли альтернативных ОРС в сегменте 9 в детерминировании цитопатических свойств вируса Кемерово на нашло экспериментального подтверждения. Также не было получено доказательств роли VP6a в модулировании вирулентности вируса Кемерово. Тем не менее, вопрос экспериментального исследования роли альтернативных рамок считывания нуждается в дальнейшей разработке и требует дальнейших исследований для формулирования окончательных заключений.

4.5 Определение видовой принадлежности вирусов группы Грейт-Айленд

В соответствии с положениями IX Доклада Международного комитета по таксономии вирусов, существует ряд критериев принадлежности представителей рода *Orbivirus* к одному виду. Одним из них является идентичность нуклеотидной последовательности сегмента, кодирующего ген субкорового белка T2 (VP3): более 76% идентичности для представителей одного вида, менее 74% для представителей разных видов (King *et al.*, 2012).

Вирусы Трибеч и Муко не только имеют более 82% нуклеотидной идентичности по последовательности белка VP3, а также реассортируют друг с другом. Поэтому, согласно нуклеотидным критериям видовой принадлежности (King *et al.*, 2012), их следует относить к одному виду.

Согласно полученным значениям нуклеотидной идентичности по второму сегменту, кодирующему последовательность белка VP3 (Приложение 4), вирусы Кемерово и Трибеч укладываются в заданные критерии принадлежности к одному виду. В пользу предположения о том, что вирусы Кемерово, Трибеч и Муко являются не самостоятельными видами, а разными геновариантами одного вида, также говорят ранее полученные данные об антигенном сходстве KEMV и TRBV (Gresikova *et al.*, 1965; Libikova *et al.*, 1965; Dedkov *et al.*, 2014a) и наличии общего переносчика (Dedkov *et al.*, 2014b). Однако для окончательных выводов о таксономической принадлежности вирусов Кемерово и Трибеч необходимо проанализировать большее число штаммов, а также охарактеризовать возможность их симпатрической циркуляции и формирования реассортантных форм.

Таким образом, результаты сравнения нуклеотидной идентичности вирусов Кемерово, Трибеч и Муко, в настоящее время считающихся самостоятельными представителями группы Грейт-Айленд, позволяют предположить, что все они в действительности могут представлять собой один полиморфный вид, широко распространённый на территории Евразии – от Восточной Европы (TRBV), через территорию России и Дальний восток (KEMV), до островов Японии (MUV).

4.6 Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово

Для оценки эпидемического потенциала вируса в соответствии с разработанными критериями необходимо обобщить и проанализировать известные данные по трём рассматриваемым группам факторов, участвующих в формировании эпидемиологической опасности.

Как было описано ранее, вирус Кемерово является РНК-содержащим, его геном, а также геном близкородственных вирусов, состоит из 10 сегментов РНК отрицательной полярности. Такая структура генома придает ему определённую лабильность – повышенную способность к изменчивости, уступающую только вирусам, содержащим РНК положительной полярности. Сегментированное строение предполагает наличие процессов реассортации, которые в отношении вируса Кемерово были доказаны в настоящем исследовании, а для ряда близкородственных вирусов – ранее (Dedkov *et al.*, 2014a). Филогенетически, вирус Кемерово имеет относительно отдалённое родство с вирусами-возбудителями актуальных инфекций человека, подлежащих надзору. Таковыми являются представители р.*Rotavirus*, возбудители ротавирусных инфекций.

Вирус Кемерово широко распространён на территории Российской Федерации и характеризуется поливекторностью. Согласно опубликованным данным, вирус обнаруживается в популяциях иксодовых клещей *I.persulcatus*, *I.ricinus*, *I.pavlovskyi*, гибридов *I.persulcatus/I.pavlovskyi* и *D.marginatus* на территории 14 регионов Российской Федерации (Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014, Tkachev *et al.*, 2017; Кривошеина *с соавт.*, 2017; Козлова *с соавт.*, 2018). Также в циркуляцию вируса оказались вовлечены территории Восточного Казахстана (Tkachev *et al.*, 2014). По неопубликованным данным собственных исследований, вирус Кемерово обнаруживается в клещах *I. persulcatus* на территории г. Кирова (Заречный парк). Также имеется информация о фактах обнаружения вируса Кемерово в иксодовых клещах, собранных на территории Приморского края, вирусоформность неизвестна.

Превалентность вируса в популяциях переносчиков характеризуется неравномерностью, которая может быть связана как с различным объёмом выборки для разных видов клещей, взятых для исследования, так и с особенностями самих регионов. На всех рассматриваемых территориях этот показатель вируса Кемерово колеблется в диапазоне от 0,2(±0,42)% в Республике Удмуртия до 10,1(±1,63)% в Вологодской области. В ряде регионов показатель заражённости клещей вирусом Кемерово превышает таковой для вируса

клещевого энцефалита (Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2017). При этом данные об аналогичных исследованиях популяций «мягкотелых» клещей, которые также могут являться переносчиками вируса Кемерово, отсутствуют (Schmidt and Shope, 1971).

Для наглядности сумму доступных на сегодняшний день данных о циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации и сопредельных государств можно отразить на карте вместе с регионами циркуляции ближайших к нему родственных представителей группы Грейт Айленд (Рисунок 21).



Рисунок 21. География распространения вирусов серогруппы Кемерово на основании данных о регионах изоляции штаммов вирусов KEMV, TRBV и MUV, и обнаружения вирусов KEMV в клещах в регионах Российской Федерации и сопредельных государств.

Примечание: 1 – Московская область; 2 – Тульская область; 3 – Вологодская область; 4 – Костромская область; 5 – Кировская область; 6 – Республика Удмуртия; 7 – Свердловская область; 8 – Курганская область; 9 – Омская область; 10 – Новосибирская область; 11 – Алтайский край; 12 – Кемеровская область; 13 – Иркутская область; 14 – Республика Алтай; 15

– Казахстан, Восточно-Казахстанская область; 16 - Республика Коми, 17 – Приморский край, 18– Египет; 19 – Словакия; 20 – Украина, Одесская область; 21 – Япония.

Регионы, в которых был выявлен вирус Кемерово, образуют практически непрерывный пояс, расположенный на умеренной широте и включающий лесные и лесостепные зоны, являющиеся естественными территориями обитания иксодид, и регион циркуляции вируса Кемерово представляет собой множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны. Однако несмотря на то, что многие регионы Российской Федерации в настоящий момент ещё не охарактеризованы по наличию в популяциях иксодовых клещей вируса Кемерово, правомерно предполагать практически повсеместное распространение вируса на территории страны и существование глобального природного резервуара, фланкированного территориями циркуляции близкородственных вирусов Трибеч и Муко, потенциально составляющих с вирусом Кемерово один вид.

Поддержание столь обширного ареала предполагает наличие средств транслокации возбудителя внутри глобального природного резервуара, в качестве которого могут выступать различные виды птиц. Роль птиц в распространении трансмиссивных инфекций в настоящий момент находится под пристальным вниманием исследователей. Уже доказано их участие в распространении вируса клещевого энцефалита, вируса Западного Нила, патогенных боррелий и риккетсий, эрлихий, анаплазм, бартонелл и бабезий (Москвитина *с соавт.*, 2014).

На сегодняшний день отсутствуют доказательства того, что птицы могут являться самостоятельным резервуаром для вирусов Кемерово, Трибеч и Муко. Однако в ряде источников приводятся обратные сведения (Черкасский, 1996). На современном этапе изучения вируса Кемерово данный вопрос пока не подвергался подробному исследованию, и возможность подтвердить либо опровергнуть существующие положения отсутствует. Вероятна роль птиц в циркуляции вируса Кемерово и его близкородственных представителей в качестве механизма транслокации заражённых клещей-переносчиков в ходе естественных миграций, поскольку среди переносчиков вируса Кемерово, а также вирусов

Трибеч и Муко присутствуют орнитофильные виды и виды-полифаги, для которых птицы выступают в качестве естественных прокормителей (Dedkov *et al.*, 2014a; Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014; Ejiri *et al.*, 2015). Это положение согласуется с данными, имеющимися для других орбивирусов, в том числе для других представителей группы Грейт-Айленд (Attoui, 2015), и подтверждается фактом изоляции штамма EgAn-1169 из аргасового клеща, который был занесён на территорию Египта перелётной птицей (Schmidt and Shope, 1971).

За счёт птиц поддерживается межсегментная реассортация, как источник генетического разнообразия у вирусов Кемерово, Трибеч и Муко. Поскольку штаммы-реассортанты происходят из географически удалённых друг от друга регионов и в отсутствие птиц, как фактора передачи, существование обнаруженных явлений невозможно (Рисунок 16). Колоссальное видовое разнообразие птиц, широкий разлёт на гнездование и зимовки, многообразие миграционных путей и возможностей их пересечения на обширной территории создают предпосылки к заносу вируса из географически удалённых территорий, дальнейшему расширению ареала циркуляции и повышению риска формирования разнообразных реассортантных форм с неизвестной патогенностью, что делает роль перелётных птиц в распространении вируса Кемерово и других представителей группы Грейт-Айленд чрезвычайно значимой.

Вирус Кемерово является возбудителем с доказанной патогенностью для человека. Вызываемые им лихорадочные состояния в сочетании с развитием в ряде описанных случаев менингоэнцефалита могут быть охарактеризованы, как тяжёлые. Инкубационный период относительно короткий, до недели (Черкасский, 1996). Все случаи заболевания людей лихорадкой Кемерово относятся к спорадической заболеваемости, при этом случаев передачи от человека к человеку не описано. Впрочем, данный путь передачи не характерен для большинства ИПК. Риск инфицирования для вируса Кемерово, как ИПК, обусловлен с тесным взаимодействием с иксодидами в эпизоотическом очаге, и свойственен определённым группам населения, пребывающим в природных ландшафтах по роду хозяйственной деятельности или с целью рекреации.

В соответствии с вышеизложенным, эпидемический потенциал вируса Кемерово оценивается следующим образом (Таблица 12):

Таблица 12. Количественная оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово

Опасность источника инфекции		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
1	2	3
Тип генетического материала вируса	Сегментированная (-)РНК и дцРНК	4
Дополнительные источники генетической изменчивости	Показана способность к внутривидовой реассортации и/или рекомбинации	4
Филогенетические взаимоотношения вируса с близкородственными представителями	Наличие в филогенетически близких родах возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	3
Характеристика организмов-резервуаров инфекции	Полигостальность, включая птиц и рукокрылых	5
Сумма по группе		16
Опасность механизма передачи		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
Ведущий механизм передачи	Трансмиссивный поливекторный	3
Характер взаимодействия человека с природным резервуаром инфекции	Регулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно только для определённых групп населения	4
Территориальная характеристика природного резервуара	Множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны	4
Возможность передачи от человека к человеку	Передача от человека к человеку отсутствует или в настоящий момент не доказана	0
Сумма по группе		11

Опасность восприимчивости макроорганизма		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
1	2	3
Восприимчивый организм	Доказана патогенность для человека	5
Обычная продолжительность инкубационного периода	От 5 дней до недели	2
Характер течения инфекционного процесса	Манифестное тяжёлое	2
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы единичные случаи заболевания	2
Сумма по группе		11
Итого по трём группам		38

Таким образом, эпидемический потенциал вируса Кемерово, полученный суммированием баллов по трём группам свойств, равен 38 (эпидемический потенциал $KEMV = 16+11+11 = 38$) и может быть охарактеризован, как средний. При этом наиболее значимой составляющей эпидемического потенциала вируса Кемерово является первая группа свойств, характеризующая опасность источника возбудителя – 16 баллов из 20. Значимость свойств первой группы обусловлена, преимущественно, строением генома вируса и механизмами формирования генетического разнообразия, что может приводить к возникновению высокопатогенных реассортантных форм. Меньшая значимость второй группы свойств обусловлена трансмиссивным механизмом передачи и относительно невысокой вероятностью его реализации среди населения, проживающего на эндемичных территориях. Третья группа свойств, характеризующая восприимчивость человека, для вируса Кемерово, по значимости сопоставима со второй, не смотря на тяжесть вызываемого вирусом заболевания. Основная причина этого – отсутствие в настоящий момент регистрируемой заболеваемости,

поскольку последние подтверждённые случаи заболевания людей лихорадкой Кемерово были зафиксированы порядка полувека назад.

Таким образом, вирус Кемерово характеризуется широким ареалом распространения, поливекторностью, высоким уровнем генетической изменчивости вследствие внутривидовой, а потенциально, - и межвидовой межсегментной реассортации и способностью транслоцироваться на большие расстояния в ходе миграций птиц. Сочетание этих факторов в определённых условиях может приводить к возникновению заболеваемости и чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, не смотря на то, что в настоящий момент случаи лихорадки Кемерово не регистрируется. Поэтому в отношении вируса Кемерово целесообразно проведение мероприятий по надзору за ИПК, включающих систематический мониторинг очагов, исследование вирусоформности популяций переносчиков и организмов-резервуаров и других мероприятий, предусмотренных нормативной документацией в отношении предупреждения возникновения и распространения ИПК (Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3310-15).

Для проверки предлагаемой системы оценки эпидемического потенциала дополнительно с помощью представленных критериев было проведено определение эпидемического потенциала ряда возбудителей природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи (Таблица 13). При этом, полученные значения и присвоенный согласно им эпидемический потенциал, в целом, соответствуют современным представлениям об эпидемиологической опасности оцененных возбудителей.

Таблица 13. Результаты оценки эпидемического потенциала возбудителей некоторых природно-очаговых инфекций

Вирус	1 группа	2 группа	3 группа	Сумма баллов	Эпидемический потенциал
1	2	3	4	5	6
Вирус Кемерово (КЕМV)	16	11	11	38	Средний
Вирус Муко (MUV)	13	8	0	21	Низкий
Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ)	12	15	15	42	Средний
Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго (ККГЛ)	17	16	14	47	Высокий
Вирус Парамушир (PARV)	10	12	0	22	Низкий
Вирус Лихорадки Западного Нила (ЛЗН)	19	13	15	47	Средний
Вирус денге (DENV)	19	15	16	50	Высокий
Вирус Зика (ZIKV)	18	15	16	49	Высокий
Вирус Японского энцефалита (ЯЭ)	19	12	14	45	Высокий
Вирус Ласса (LASV)	16	18	14	48	Высокий
Вирус Луйо (LUJV)	15	13	11	39	Средний
Вирус Эбола Заир (EBOV)	8	18	14	40	Средний
Вирус Рестон (RESTV)	9	8	1	18	Низкий
Вирус бешенства (RABV)	16	10	14	40	Средний
Вирус Хатанга (CHTV)	15	7	1	23	Низкий
Вирус Добрава (DOBV)	15	14	16	45	Высокий

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
Вирус Пуумала (PUUV)	15	14	16	45	Высокий
Вирус Вад-Медани (WMV)	12	8	0	20	Низкий

Возбудители особо опасных инфекций I-II группы патогенности, такие как вирус Эбола Заир, вирус Ласса, вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, способные передаваться нетрансмиссивно, а также от человека к человеку, обладают высоким эпидемическим потенциалом. Возбудители II группы патогенности с трансмиссивным механизмом передачи обладают средним и приближающимся к высокому эпидемическим потенциалом, который ограничивается отсутствием возможности нетрансмиссивной передачи или отсутствием передачи от человека к человеку (например, для вируса клещевого энцефалита). Малоизученные, непатогенные для человека вирусы и вирусы с ещё недоказанной патогенностью ожидаемо обладают низким эпидемическим потенциалом. Однако, по мере их изучения и появления новых данных, текущее значение эпидемического потенциала для них может измениться.

Таким образом, предложенная система оценки эпидемического потенциала показала свою работоспособность, и позволяет не только представить способность возбудителей к формированию эпидемического процесса в количественном выражении, а также сравнивать эпидемический потенциал различных возбудителей между собой и оценивать в полученном значении удельный вес каждого из трёх факторов эпидемиологической опасности, составляющих компоненты эпидемического процесса. В дальнейшем система оценки может быть расширена за счёт внесения новых значимых показателей или усовершенствована иным образом, что позволит ей стать универсальным инструментом в рамках развивающегося подхода «аналитики вспышек» (Polonsky *et al.*, 2019) и предупреждения угроз возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера.

5. Заключение

Как показало исследование с использованием литературных и собственных данных, вирус Кемерово широко распространён на территории Российской Федерации. Регионы его циркуляции формируют глобальный природный резервуар, охватывающий естественные территории обитания иксодид.

При этом информация о циркуляции вируса Кемерово продолжает дополняться, благодаря тому, что исследование на вирус Кемерово начинает на постоянной основе входить в схему проведения скринингового исследования на ИПК клещей, собранных с территорий, в различных регионах Российской Федерации.

В рамках настоящей работы произведен всесторонний сравнительный анализ полученных геномных последовательностей вируса Кемерово и полных геномов других вирусов группы Грейт Айленд. В частности, произведена оценка нуклеотидной идентичности вирусов группы по последовательности структурного субкорового белка VP3 (T2). Именно этот показатель, по информации международного конгресса по таксономии вирусов, является одним из критериев установления видовой принадлежности орбивирусов.

Выполнена филогенетическая реконструкция внутривидовых взаимоотношений для штаммов вируса Кемерово, по результатам которой была показана множественная сегментная реассортация.

Филогенетическая реконструкция межвидовых взаимоотношений вирусов группы Грейт-Айленд впервые демонстрирует межвидовую сегментную реассортацию вируса Трибеч и вируса Муко, который был описан, как самостоятельный вид, в 2015 году японскими учёными.

Проведено исследование альтернативных рамок считывания в сегменте 9. Исследуемые штаммы условно разделились на 2 группы по двум типам рамок: короткой и длинной. Глубокий анализ результатов высокопроизводительного секвенирования также выявил гетерогенность одного из штаммов – штамма k10 – по конфигурации альтернативной рамки. Примерно половина клонов штамма

имела короткую рамку считывания, терминируемую опаловым стоп-кодоном, тогда как у другой половины опаловый стоп-кодон был заменён на аминокислоту и формировалась альтернативная рамка полной длины.

Было высказано предположение о роли подобных конфигураций в проявлении цитопатических свойств вируса и предпринята попытка установить связь конфигурации альтернативной рамки считывания в 9 сегменте с патогенностью вируса в отношении различных клеток млекопитающих. Исследуемыми штаммами заражали культуры клеток СПЭВ и ВНК-21 и по окончании 48-часовой инкубации оценивали ЦПД и концентрацию вирусной РНК в культуральной жидкости. По итогам, корреляции между конфигурацией альтернативной рамки и способностью вызывать ЦПД в данном опыте у изучаемых штаммов выявлено не было.

Для оценки эпидемического потенциала вируса Кемерово разработана система оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций. Как показало исследование, понятие эпидемического потенциала тесно связано с понятием эпидемиологической опасности, формирующей эпидемиологический риск и складывающейся из опасностей источника инфекции, механизма передачи и восприимчивости организма в соответствии с классической триадой эпидемического процесса Громашевского. Поэтому в рамках созданной системы количественной оценки эпидемического потенциала был определён ряд показателей, разделённых на три группы по опасности каждого из элементарных звеньев эпидемического процесса.

Согласно разработанным критериям, эпидемический потенциал вируса Кемерово оценивается как средний со значением 38 в балльном выражении. Наиболее значимой составляющей эпидемического потенциала вируса Кемерово является первая группа свойств, характеризующая опасность источника возбудителя инфекции и обусловленная строением генома вируса и механизмами формирования генетического разнообразия, что влияет на устойчивость природных очагов вируса, а также может приводить к возникновению высокопатогенных реассортантных форм.

Для проверки предлагаемой системы оценки эпидемического потенциала дополнительно с помощью представленных критериев было проведено определение эпидемического потенциала ряда возбудителей природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи. Полученные значения и присвоенный согласно им эпидемический потенциал, в целом, соответствуют современным представлениям об эпидемиологической опасности оцененных возбудителей природно-очаговых инфекций. Малоизученные, непатогенные для человека вирусы и вирусы с ещё недоказанной патогенностью ожидаемо обладают низким эпидемическим потенциалом. Однако, по мере их изучения и появления новых данных, текущее значение эпидемического потенциала для них может измениться.

Таким образом, предложенная система оценки эпидемического потенциала показала свою работоспособность, и позволяет не только представить способность возбудителей к формированию эпидемического процесса в количественном выражении, а также сравнивать эпидемический потенциал различных возбудителей между собой и оценивать в полученном значении удельный вес каждого из трёх факторов эпидемиологической опасности, составляющих компоненты эпидемического процесса. Система позволяет оценить имеющиеся пробелы в знаниях о той или иной инфекционной патологии, и универсальна для природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи.

Охарактеризованные в рамках настоящего исследования последовательности генома 10 штаммов вируса Кемерово позволили существенно обогатить объём знаний о генетическом разнообразии этого вируса и его связях с близкородственными вирусами группы Грейт-Айленд. Впервые были продемонстрированы многочисленные реассортационные события, как для вируса Кемерово, так и других представителей группы. Был показан высокий уровень нуклеотидного сходства между вирусами Кемерово, Трибеч и Муко, что указывает на общее происхождение и потенциальную принадлежность к одному виду. Однако для окончательного заключения по данному вопросу требуется

более детальное понимание сложных взаимоотношений вирусов внутри генетической группы, что требует получения большего числа полногеномных последовательностей, изоляции и секвенирования современных штаммов, а также дальнейших исследований экологических аспектов их циркуляции. Широкая область распространения, охватывающая большую часть евразийского континента, высокая генетическая лабильность, поливекторность и способность транслоцироваться на большие расстояния позволяют охарактеризовать вирус Кемерово, как возбудитель ИПК со средним эпидемическим потенциалом, что оправдает дальнейшие исследования вируса. Наряду с этим необходимо включение вируса Кемерово в систему надзора за возбудителями ИПК, как потенциального возбудителя инфекционных заболеваний II группы патогенности, который может стать эпидемиологически значимым в будущем.

На современном этапе изучения вируса Кемерово заболеваемость людей лихорадкой Кемерово не регистрируется, и вопрос о патогенности вируса для человека остаётся открытым. Неизвестно, были ли патогенные свойства вируса ослаблены или утрачены в результате реассортационных явлений, или возможные случаи заболевания людей ввиду отсутствия специфической диагностики регистрируются под другими диагнозами. Поэтому немаловажной составляющей данных мероприятий является выявление больных лихорадкой Кемерово. Все возникающие на эндемичных территориях случаи заболевания людей лихорадками и неврологическими нарушениями неясного генеза должны проверяться на этиологическую связь с вирусом Кемерово. Целесообразен также серологический скриннинг, позволяющий выявить случаи лёгкого или бессимптомного течения и охарактеризовать проявления лихорадки Кемерово на современном этапе. В настоящий момент выявление серопозитивных в отношении вируса Кемерово лиц не производится, но согласно данным, представленным в 1974 году (Михайлова, 1974), до 10,6% населения, проживающего на территориях выделения вируса, в течение жизни сталкивались с вирусом и имели к нему антитела.

Тем не менее, формирование мер по надзору за вирусом Кемерово в настоящий момент ограничено наличием доступных диагностических инструментов для прямого определения вируса и серологических исследований. Все существующие современные диагностикумы для обнаружения РНК вируса методом ПЦР созданы исследовательскими коллективами, занимающимися изучением вируса Кемерово, их применение для медицинских целей ограничено, как и доступность для широкого круга пользователей. Диагностикумы для серологических исследований в настоящий момент вовсе отсутствуют.

Следует отметить, что в настоящий момент в Российской Федерации изучением вируса Кемерово занимаются, по меньшей мере, три независимых научных коллектива. Интерес к вирусу со стороны учёных растёт, результаты исследований остаются востребованными, поэтому можно предполагать, что в будущем многие проблемные вопросы в его изучении будут разрешены.

6. Выводы

1. Вирус Кемерово (р. *Orbivirus*, сем. *Reoviridae*) широко распространен на территории Российской Федерации. При этом ареал циркуляции вируса представляет собой глобальный природный резервуар в лесных и лесостепных зонах умеренного пояса, являющихся естественными территориями обитания иксодид.
2. Методика приготовления геномных библиотек РНК-содержащих вирусов усовершенствована для проведения секвенирования высокопроизводительными методами с использованием платформ второго поколения, что позволяет с высокой точностью одновременно расшифровывать нуклеотидную последовательность для группы штаммов.
3. На основании филогенетического анализа установлена способность вируса Кемерово и других представителей группы Грейт-Айленд к внутри- и межвидовой сегментной реассортации.
4. Показатель нуклеотидной идентичности по сегменту 2 между вирусами Кемерово, Трибеч и Муко находится в диапазоне 74,39 – 99,53 %, что позволяет рассматривать их как разные геноварианты одного вида.
5. Влияние альтернативных рамок считывания в сегменте 9 на вирулентность вируса Кемерово не подтверждено.
6. Вирус Кемерово обладает средним эпидемическим потенциалом, в соответствии с разработанной шкалой оценки эпидемического потенциала, обусловленным широким ареалом распространения вируса, высоким уровнем генетической изменчивости, поливекторностью и способностью транслоцироваться на большие расстояния в отсутствие регистрируемой заболеваемости, что делает целесообразным включение вируса Кемерово в систему надзора за инфекциями, передающимися клещами.

7. Перспективы дальнейшей разработки темы

Исследования на вирус Кемерово начинают на постоянной основе входить в схему проведения скрининговых исследований на ИПК клещей, собранных с территорий, в различных регионах российской Федерации. Расширение перечня регионов, проводящих подобные исследования, позволит постоянно обновлять и дополнять информацию о циркуляции вируса Кемерово.

Включение вируса Кемерово в программу систематического мониторинга за ИПК подразумевает разработку соответствующих надзорных мероприятий, которая влечёт за собой необходимость разработки и внедрения в диагностическую практику валидированных средств для выявления вируса Кемерово в биологическом материале для диагностики и проведения ретроспективных исследований серопревалентности среди населения, проживающего в эндемичных регионах.

Существующая в настоящий момент тест-система для выявления РНК вируса Кемерово методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Дедков с соавт., 2012) подлежит регистрации в качестве медицинского изделия для использования в диагностической практике.

Полученные данные о таксономическом положении вирусов Кемерово, Трибеч и Муко могут послужить основанием для пересмотра критериев видовой принадлежности орбивирусов.

8. Список сокращений

AVAV – вирус Авалон

BHAV – вирус Бханджа

CHTV – вирус Хатанга

DENV – вирус денге

DHOV – вирус Дхори

DOBV – вирус Добрава

EBOV Zaire – вирус Эбола Заир

GIV – вирус Грейт-Айленд

GTR – general time-reversible model

KEMV – вирус Кемерово

LASV – вирус Ласса

LUJV – вирус Луйо

MUV – вирус Муко

NGS – next-generation sequencing

OKHV – вирус Охотский

PARV – вирус Парамушир

PUUV – вирус Пуумала

RABV – вирус бешенства

RESTV – вирус Рестон

SNV – single nucleotide variants

TRBV – вирус Трибеч

TYUV – вирус Тюлений

UUKV – вирус Укуниемеи

WMV – вирус Вад Медани

ZIKV – вирус Зика

ZTV – вирус Залив Терпения

АПЛ – астраханская пятнистая лихорадка

АЧС – африканская чума свиней

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека

ддНТФ – дидезоксинуклеозидтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ИПК – инфекции, передающиеся клещами

ИФА – иммуноферментный анализ

ККГЛ – геморрагическая лихорадка Крым-Конго

ККЭ – клетки куриного эмбриона

ЛЗН – лихорадка Западного Нила

МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека

ОРС – открытая рамка считывания

ПО – программное обеспечение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СМV – вирус Кло-Мор

СКТ – сибирский клещевой тиф

ЦНС – центральная нервная система

ЦПД – цитопатическое действие

ЯЭ – Японский энцефалит

9. Список использованных источников

1. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/499061798> (дата обращения 07.08.2019).
2. Бутенко, А.М. Вирус Дхори - возбудитель заболевания человека. Пять случаев лабораторной инфекции / А.М. Бутенко, Е.В. Лещинская, И.В. Семашко, М.А. Донец, Л.И. Мартьянова // Вопросы вирусологии. №6. - 1987. - с. 724-729
3. Виноград, И.А. Изоляция вирусов группы Укуниими из членистоногих и птиц в Черновицкой области / И.А. Виноград, С.Я. Гайдамович, О.Г. Марущак, Е.Г. Рогочий, И.А. Емдина, В.Р. Обухова, Г.В. Белецкая // В. кн. Проблемы медицинской вирусологии. – М.,1991. – С. 116-121.
4. Воинов И.Н. Изучение арбовирусных инфекций Беларуси и других восточных регионов СССР / И.Н. Воинов // Арбовирусы / под ред. С.Ю. Гайдамовича. – Ин-т вирусологии АМН СССР, М., 1978. – С. 20-24.
5. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» [Электронный ресурс]. – URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053 (дата обращения 10.06.2019).
6. Громашевский, Л. В. Общая эпидемиология / 4-е изд. — М. : Медицина, 1965. – 290 с.
7. Дедков, В.Г. Обнаружение вируса Кемерово в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных в Алтайском крае / В.Г. Дедков, А.А. Девяткин, М.В. Бекова, М.Л. Маркелов, О.В. Бесхлебова, В.М. Гранитов, С.Н. Шпынов, А.П. Гмыль, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Вып.6,№79. – С. 46-50.
8. Дедков, В.Г. Разработка тест-системы для определения РНК вируса Кемерово в формате ПЦР в реальном времени / В.Г. Дедков, М.Л. Маркелов, Я.А.

Войцеховская, Г.Г. Карганова, А.П. Гмыль, Л.И. Козловская, Г.П. Пиванова, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Акт. Вопросы. – 2012. – №3. – С. 38-41.

9. Дедков, В.Г. Эпидемиологическая значимость вируса Кемерово на территории Российской Федерации: дисс. канд. мед. наук : 14.02.02 / Владимир Георгиевич Дедков ; Москва. ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. – М., 2015. – 134 л.

10. Изотов, В.К. Материалы по изучению цитопатогенного вируса, выделенного в очаге клещевого энцефалита / В.К. Изотов, Е.С. Сарманова, И.А. Прохорова, З.И. Вежеватова, Л.К. Березина, В.Г. Панышина // Матер. XIII научн. сессии Института полиомиелита. – М., 1967. – С. 118.

11. Карпович, Л.Г. Дальнейшее изучение некоторых биологических и культуральных свойств кемеровского вируса / Л.Г. Карпович // Матер. XII научн. сессии Института полиомиелита. – М., 1965. – С. 182-183.

12. Кисличкина, А.А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного, неосновного подвидов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex / А.А. Кисличкина, Л.А. Кадникова, М.Е. Платонов, Н.В. Майская, Л.В. Коломбет, В.И. Соломенцев, А.Г. Богун, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2017. — №2. — С. 5-10.

13. Козлова, Т. В. Выявление "новых" возбудителей очаговых инфекций в иксодовых клещах на территории Тульской области / Т.В. Козлова, Т.И. Хомякова, В.Г. Дедков, М.В. Сафонова, Л.С. Карань, Я.Е. Григорьева, В.В. Козлов, А.А. Лопатин, С.М. Иванова, Ю.Н. Хомяков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2018. – Вып.4, №23. – С. 172-177

14. Коренберг, Э.И. Природная очаговость инфекций: современные проблемы и перспективы исследований / Э.И. Коренберг // Зоологический журнал. – 2010. – Вып.89, № 1. – С. 5–17

15. Кривошеина, Е.И. Выявление вируса Кемерово в иксодовых клещах, собранных в республике Коми / Е.И. Кривошеина, А.И. Кузнецов, М.Ю. Карташов, Т.П. Микрюкова // Сборник тезисов IV международной конференции

молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – Новосибирск, 2017. – С. 155-158.

16. Львов, Д. К. Арбовирусные инфекции / Д.К. Львов, С.М. Клименко, С.Я. Гайдамович. – М. : Медицина, 1989. – 334 с.

17. Львов, С.Д. Изоляция вирусов Залива Терпения, Укуниими и Тягиня-соподобного вируса из комаров, собранных в тундре, лесо-тундре и северной тайге полуострова Кольский, Таймыр и средней тайге Карелии / С.Д. Львов, В.Л. Громашевский, Г.В. Богоявленский, Ф.Н. Байлук, Т.М. Скворцова, Н.Г. Кондрашина, Е.К. Кандауров // Мед. паразитол. и параз. б-ни. – 1987. – Вып.65, №6. – С. 40-43.

18. Малеев, В.В. Проблемы инфекционной патологии на современном этапе / В.В. Малеев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. – №4. – С.11–14

19. Михайлова, И. С. Материалы изучения природных очагов вируса Кемерово и его роли в патологии человека : дисс. канд. мед. наук / Инна Степановна Михайлова ; Москва. ин-т полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1974. – 139 л.

20. Москвитина, Н.С. Возможная роль мигрирующих птиц в распространении клещевых инфекций на территории Сибири и Дальнего Востока России / Н.С. Москвитина, И.Г. Коробицын, О.Ю. Тютеньков, С.И. Гашков, Ю.В. Кононова, С.С. Москвитин, В.Н. Романенко, Т.П. Микрюкова, Е.В. Протопопова, М.Ю. Карташов, Е.В. Чаусов, С.Н. Коновалова, Н.Л. Тупота, А.О. Семенцова, В.А. Терновой, В.Б. Локтев // Успехи наук о жизни. – 2014. – №9. – С. 127-131.

21. Павловский, Е.Н. О природной очаговости инфекционных и паразитарных болезней / Е.Н. Павловский // Вестник АН СССР. – 1939. – № 10. – С. 98–108.

22. Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3310-15 [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420319715> (дата обращения 23.07.2019).

23. Ребриков Д.В. NGS. Высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, В.В. Ильинский. – М. : Бином.Лаборатория знаний, 2015. – 295с.

24. Рябицев, В.К. Птицы Урала, Приуралья и Западной Сибири. Справочник-определитель / В.К. Рябицев. – Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2008. – 634 с.
25. Семашко, И. В. Сравнительное изучение вирусов группы Кемерово : дисс. канд. мед. наук / Ирина Васильевна Семашко ; Москва. ин-т полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1971. – 259 л.
26. Симонова, Е. Г. Современный этап развития эпидемиологического надзора и перспективы его совершенствования / Е.Г. Симонова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. Вып.16,№4. – С.4–8
27. Симонова, Е. Г. Предэпидемическая диагностика в системе риск-ориентированного эпидемиологического надзора над инфекционными болезнями / Е.Г. Симонова, В.И. Сергеевич // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. Вып.17,№5. – С. 31–37
28. Тарасевич, Л.Н. Изучение свойств цитопатогенных вирусов, выделенных в природном очаге клещевого энцефалита в Новосибирской области / Л.Н. Тарасевич // Вопросы инф. Патологии. – 1970а. – Вып.2. – С. 220-221.
29. Тарасевич, Л.Н. К вопросу о распространенности цитопатогенного вируса в популяции клещей *I. Persulcatus* в Новосибирской области / Л.Н. Тарасевич, П.И. Чудинов, И.И. Богданов, Л.А. Мелентьева // Вопросы инф. Патологии – 1970б. – Вып.2. – С. 45-47.
30. Черкасский, Б. Л. Особо опасные инфекции / Б.Л. Черкасский. – М. : Медицина, 1996. – 160 с.
31. Черкасский, Б. Л. Риск в эпидемиологии / Б.Л. Черкасский. – М. : Практическая медицина, 2007. – 480 с.
32. Чумаков, М. П. Изоляция в Западной Сибири из клещей *I. persulcatus* и от больных людей вируса, отличающегося от возбудителя клещевого энцефалита / М.П. Чумаков, Л.Г. Карпович, Е.С Сарманова., Г.И. Сергеева, М.В. Бычкова, В.О. Тапупере, Е.С. Либикова, Е. Майер, Р. Ржегачек, О. Кожух, Э. Эрнек // Клещевой энцефалит и др. арбовирусные инфекции. – М.-Минск, 1962. – С. 5-7.

33. Шкарин, В.В. Новые инфекции: систематизация, проблемы, перспективы / В.В. Шкарин, О.В. Ковалишена. – Нижний Новгород : Изд-во НГМА, 2012. – 510 с.
34. Шкарин, В.В. Проблемы и перспективы системы мониторинга за новыми инфекциями / В.В. Шкарин, О.В. Ковалишена // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. – №4. – С. 4 – 9
35. Юдин, К.А. Фауна России и сопредельных стран. Птицы. Том 2, выпуск 2 / К.А. Юдин, Л.В. Фирсова. – СПб.: Наука, 2002. – 667 с.
36. 12 методов в картинках: секвенирование нуклеиновых кислот [Электронный ресурс]. – URL: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovyykh-kislot> (дата обращения 13.04.2019)
37. Albrecht, P. Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections / P. Albrecht // Curr Top Microbiol Immunol. – 1968. – Vol.43. – P. :44-91.
38. Applied Biosystems integrated systems for genetic analysis [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/applied-biosystems.html> (дата обращения 11.04.2019).
39. Arbovirus Catalog. Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс]. – URL: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/> (дата обращения 21.04.2019)
40. Attoui, H. Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy / H. Attoui, S.S. Maan, S.J. Anthony, P.P.C. Mertens // Bluetongue monograph / ed. by. P.S. Mellor, M. Baylis, P.P.C. Mertens. – London : Elsevier Academic Press, 2009. – P. 23-52.
41. Attoui, H. Zoonotic and emerging orbivirus infections / H. Attoui, F. Mohd Jaafar // Rev Sci Tech. – 2015. – Vol.34,№2. – P. 353-361.
42. Baroni, D. MicroRNA target and gene validation in viruses and bacteria / D. Baroni, P. Arrigo // Methods Mol Biol. – 2014. - №1107. – P. 223-231.
43. Bartíková, P. Tick-borne viruses / P. Bartíková, V. Holíková, M. Kazimírová, I. Štibrániová // Acta Virol. – 2017. – Vol.61,№4. – P. 413-427

44. Barzon L. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology / L. Barzon, E. Lavezzo, V. Militello, S. Toppo, G. Palù // *Int J Mol Sci.* – 2011. – Vol.12,№11. – P. 7861-7884.
45. Belaganahalli, M.N. Genetic characterization of the tick-borne orbiviruses / M.N. Belaganahalli, S. Maan, N.S. Maan, J. Brownlie, R. Tesh, H. Attoui, P. Mertens // *Viruses.* – 2015. – Vol.7,№5. – P. 2185-2209.
46. Belhouchet, M. Complete sequence of Great Island virus and comparison with the T2 and outer-capsid proteins of Kemerovo, Lipovnik and Tribec viruses (genus Orbivirus, family Reoviridae) / M. Belhouchet, F. Mohd Jaafar, R. Tesh, J. Grimes, S. Maan, P.P.C. Mertens, H. Attoui // *J. Gen. Virol.* – 2010. – Vol.91,№12. – P. 2985–2993.
47. Belhouchet, M. Detection of a Fourth Orbivirus Non-Structural Protein / M. Belhouchet, F.M. Jaafar, A.E. Firth, J.M. Grimes, P.P.C. Mertens, H. Attoui. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol.6,№10: e25697.
48. Bell, D.C. DNA base identification by electron microscopy / D.C. Bell, W.K. Thomas, K.M. Murtagh, C.A. Dionne, A.C. Graham, J.E. Anderson, W.R. Glover // *Microsc Microanal.* – 2012. – Vol.18,№5. – P. 1049-1053.
49. Benson, D.A. GenBank / D.A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, K. Clark, D.J. Lipman, J. Ostell, E.W. Sayers // *Nucleic Acids Res.* – 2012. - №40(Database issue). – P. D48-53.
50. Bettencourt, L.M. Real time bayesian estimation of the epidemic potential of emerging infectious diseases / L.M. Bettencourt, R.M. Ribeiro // *PLoS One.* – 2008. – Vol.3,№5:e2185.
51. Borden, E.C. Physicochemical and morphological relationship of some arthropod-borne viruses to Bluetongue virus. A new taxonomic group / E.C. Borden, R.E. Shope, F.A. Murphy // *Physicochemical and serologic studies. J. Gen. Virol.* – 1971. – Vol.13,№2. – P. 261.
52. Calisher, C.H. Human infection with Bhanja virus / C.H. Calisher, H.C. Goodpasture // *Am J Trop Med Hyg.* – 1975. – Vol.24,№6,Pt1. – P. 1040-1042.

53. Campbell, F. When are pathogen genome sequences informative of transmission events? / F. Campbell, C. Strang, N. Ferguson, A. Cori, T. Jombart // *PLoS Pathog.* – 2018. – Vol.14,№2:e1006885.
54. Campos, G.S. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil / G.S. Campos, A.C. Bandeira, S.I. Sardi // *Emerg Infect Dis.* – 2015. – Vol.21,№10. – P. 1885-1886.
55. Casals, J. Antigenic characterization of tick-borne arboviruses not belonging to group B / J. Casals // *Jpn J. Med Sci Biol.* – 1967. – №20. – P. 119-129.
56. Casals, J. Filtration of arboviruses through 'Millipore' membranes / J. Casals // *Nature.* – 1968a. – Vol.217,№5123. – P. 648-649.
57. Casals, J. Identification of viral strains / J. Casals // *Yale arbovirus Res. Unit.* – 1965. – ann. Rep. – P. 1-27.
58. Casals, J. Problems encountered in the classification and nomenclature of the arthropod-borne viruses (Arboviruses) / J. Casals // *Am J Epidemiol.* – 1968b. – Vol.88,№2. – P. 147-148.
59. Cauchemez, S. Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility / S. Cauchemez, C. Fraser, M.D. Van Kerkhove, C.A. Donnelly, S. Riley, A. Rambaut, N.M. Ferguson // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2014. – Vol.14,№1. – P. 50–56.
60. Chen, H. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl / H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K.S. Li, R.G. Webster, J.S. Peiris, Y. Guan // *Nature.* – 2005. – Vol.436,№7048. – P. 191-192.
61. Chumakov, M.P. Report of Isolation from *Ixodes persulcatus* ticks and from patients in Western Siberia of a virus differing from agent of tick-borne encephalitis / M.P. Chumakov, E. Ernek, O. Kozuch, E. Sarmanov, Sergeeva G.I., V.O. Tapupere, M.B. Bychkova, L.G. Karpovich, H. Libikova, J. Rehacek, V. Mayer // *Acta Virol.* – 1963. – Vol.7,№1. – P. 82–83.
62. Cock, P.J. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants / P.J. Cock, C.J. Fields, N. Goto, M.L. Heuer, P.M. Rice // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol.38,№6. – P. 1767-1771.

63. Dedkov, V.G. Characterization of two strains of Tribeč virus isolated in Ukraine / V.G. Dedkov, D.A. Dubina, O.A. Yurchenko, M.V. Bekova, A.V. Valdokhina, G.A. Shipulin // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2014a. – Vol.14,№11. – P. 808-816.
64. Dedkov, V.G. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation / V.G. Dedkov, M.L. Markelov, K.A. Gridneva, M.V. Bekova, A.P. Gmyl, L.I. Kozlovskaya, G.G. Karganova, L.Iu. Romanova, V.V. Pogodina, V.V. Yakimenko, G.A. Shipulin // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2014b. – Vol.5,№6. – P. 651-655.
65. Dilcher, M Genetic characterization of Tribeč virus and Kemerovo virus, two tick-transmitted human-pathogenic Orbiviruses / M. Dilcher, L. Hasib, M. Lechner, N. Wieseke, M. Middendorf, M. Marz, A. Koch, M. Spiegel, G. Dobler, F.T. Hufert, M. Weidmann // *Virology.* – 2012. – №423. – P. 68–76.
66. Dörrbecker, B. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host / B. Dörrbecker, G. Dobler, M. Spiegel, F.T. Hufert // *Travel Med Infect Dis.* – 2010. – Vol.8,№4. – P. 213-222.
67. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol.32,№5. – P. 1792-1797.
68. Eisenstein, M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz / M. Eisenstein // *Nat Biotechnol.* – 2012. – Vol.30,№4. – P. 295-296.
69. Ejiri, H. Genetic and biological characterization of Muko virus, a new distinct member of the species Great Island virus (genus Orbivirus, family Reoviridae), isolated from ixodid ticks in Japan / H. Ejiri, C.K Lim, H. Isawa, R. Kuwata, D. Kobayashi, Y. Yamaguchi, M. Takayama-Ito, H. Kinoshita, S. Kakiuchi, M. Horiya, A. Kotaki, T. Takasaki, K. Maeda, T. Hayashi, T. Sasaki, M. Kobayashi, M. Saijo, K. Sawabe // *Arch Virol.* – 2015. – Vol.160,№12. – P. 2965-2977.
70. Ernek, E. Isolation of Tribec virus from the blood of sentinel pastured goats in Tribec region (Slovakia) / E. Ernek, O. Kozuch, M. Gresiková // *Acta Virol.* – 1966. – Vol.10,№4. – P. 367-368.
71. Ewing, B. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment / B. Ewing, L. Hillier, M.C. Wendl, P. Green // *Genome Res.* – 1998. – Vol.8,№3. – P. 175-185.

72. Fan, H.C. Whole-genome molecular haplotyping of single cells / H.C. Fan, J. Wang, A. Potanina, S.R. Quake // *Nat Biotechnol.* – 2011. – Vol.29,№1. – P. 51-57.
73. Firth, A.E. Bioinformatic analysis suggests that the Orbivirus VP6 cistron encodes an overlapping gene // A.E. Firth // *Virology Journal.* – 2008. – Vol.5,№1 : 48.
74. Fraser C. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings / C. Fraser, C.A. Donnelly, S. Cauchemez, W.P. Hanage, M.D. Van Kerkhove, T.D. Hollingsworth, J. Griffin, R.F. // *Science.* – 2009. – Vol.324,№5934. – P. 1557-1561.
75. GenBank and WGS Statistics [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/> (дата обращения 05.04.2019).
76. Gmyl L.V. Kemerovo virus proteins / L.V. Gmyl // *Presentation.* – 2013.
77. Gorman, B.M. On the evolution of orbiviruses / B.M. Gorman // *Intervirology.* – 1983. – Vol.20,№2-3. – P. 169-180.
78. Gouet, P. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography / P. Gouet, J.M. Diprose, J.M. Grimes, R. Malby, J.N. Burroughs, S. Zientara, D.I. Stuart, P.P. Mertens // *Cell.* – 1999. – Vol.97,№4. – P. 481-490.
79. Gould, E. Emerging arboviruses: Why today? / E. Gould, J. Pettersson, S. Higgs, R. Charrel, X. de Lamballerie // *One Health.* – 2017. – Vol.4. – P. 1-13.
80. Gratz, N.G. The vector- and rodent-borne diseases of Europe and North America: their distribution and public health burden / N.G Gratz // *Cambridge Univ Press.* – Cambridge,2006. – P. 393.
81. Greninger, A.L. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis / A.L. Greninger, S.N. Naccache, S. Federman, G. Yu, P. Mbala, V. Bres, D. Stryke, J. Bouquet, S. Somasekar, J.M. Linnen, R. Dodd, P. Mulembakani, B.S. Schneider, J.J. Muyembe-Tamfum, S.L. Stramer, C.Y. Chiu // *Genome Med.* – 2015. – №7. – P. 99.
82. Gresikova, M. Study on ecology of Tribec virus / M. Gresikova, J. Nosek, O. Kozuch, E. Ernek, M. Lichard // *Acta Virol.* – 1965. – Vol.9,№1. – P. 83–88.

83. He, C.Q. Intragenic recombination as a mechanism of genetic diversity in bluetongue virus / C.Q. He, N.Z. Ding, M. He, S.N. Li, X.M. Wang, H.B. He, X.F. Liu, H.S. Guo // *J Virol.* – 2010. – Vol.84,№21. – P. 11487-11495.
84. Holmes, E.C. Pandemics: spend on surveillance, not prediction / E.C. Holmes, A. Rambaut, K.G. Andersen // *Nature.* – 2018. – Vol.558,№7709. – P. 180–182.
85. Hubálek, Z. Tick-borne viruses in Europe / Z. Hubálek, I. Rudolf // *Parasitol Res.* – 2012. – Vol.111,№1. – P. 9-36.
86. Huismans, H. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses / H. Huismans, H.J. Els // *Virology.* – 1979. – №92. – P. 397–406.
87. Huismans, H. Identification of the serotype specific and group-specific antigens of bluetongue virus / H. Huismans, B.J. Erasmus // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 1981. – Vol.48,№2. – P. 51–58.
88. Hyatt, A.D. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A / A.D. Hyatt, Y. Zhao, P. Roy // *Virology.* – 1993. – №193. – P. 592–603.
89. Hynes, W.L. How Ticks Control Microbes: The innate immune response / W.L. Hynes // *Biology of Ticks, 2nd Edition* / ed. by. D.E. Sonenshine and R.M. Roe. – Oxford : Oxford University Press, 2014. – P. 129-146.
90. Kahvejian, A. What would you do if you could sequence everything? / A. Kahvejian, J. Quackenbush, J.F. Thompson // *Nat Biotechnol.* – 2008. – Vol.26,№10. – P. 1125-1133.
91. Karamisheva, V. The study of the interaction of the Kemerovo virus with cells of various tissue cultures. The dynamics of the accumulation of viral antigen in cells of tissue cultures infected with Kemerovo virus, detected by the method of fluorescent antibodies / V. Karamisheva, N. Shestopalova, T. Tihonova, L. Karpovich, M. Chumakov // *Acta virologica.* – 1967. – Vol.11,№2. – P. 135-139.
92. Kasianowicz, J.J. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel / J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D.W. Deamer // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – Vol.93,№24. – P. 13770-13773.

93. King, A. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses / A. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz // Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – 2012.
94. Kozarewa, I. Overview of Target Enrichment Strategies / I. Kozarewa, J. Armisen, A.F. Gardner, B.E. Slatko, C.L. Hendrickson // Curr Protoc Mol Biol. – 2015. – №112. – P. 7.21.1-7.21.23.
95. Labuda, M. Tick-borne viruses / M. Labuda, P.A. Nuttall // Parasitology. – 2004. – №129. – Suppl : S221–S245.
96. Lanciotti, R.S. Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus / R.S. Lanciotti, M.L. Ludwig, E.B. Rwaguma, J.J. Lutwama, T.M. Kram, N. Karabatsos, B.C. Cropp, B.R. Miller // Virology. – 1998. – Vol.252,№1. – P. 258-268.
97. Lee, J.S. Targeted Enrichment for Pathogen Detection and Characterization in Three Felid Species / J.S. Lee, R.S. Mackie, T. Harrison, B. Shariat, T. Kind, T. Kehl, M. Löchelt, C. Boucher, S. VandeWoude // J Clin Microbiol. – 2017. – Vol.55,№6. – P. 1658-1670.
98. Li, Z. Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap-layout-consensus and de-bruijn-graph / Z. Li, Y. Chen, D. Mu, J. Yuan, Y. Shi, H. Zhang, J. Gan, N. Li, X. Hu, B. Liu, B. Yang, W. Fan // Brief Funct Genomics. – 2012. – Vol.11,№1. – P. 25-37.
99. Libíková, H. Behaviour of Kemerovo group viruses in chicks, chick embryos and chick embryo cell cultures / H. Libíková // Acta Virol. – 1970a. – Vol.14,№3. – P. 217-228.
100. Libikova, H. Cytopathic viruses isolated from Ixodes ricinus ticks in Czechoslovakia / H. Libikova, J. Rehacek, E. Ernek, M. Gresikova, J. Somogyio, O. Kozuch // Acta Virol. – 1964. – Vol.8,№1. – P. 96–106.
101. Libíková, H. Experimental infection of monkeys with Kemerovo virus / H. Libíková, J. Tesarová, J. Rajcáni // Acta Virol. – 1970. – Vol.14,№1. – P. 64-69.

102. Libíková, H. Pathogenicity and pathogenesis of Kemerovo virus and Kemerovo virus-like viruses in some laboratory and domestic mammals / H. Libíková, E. Ernek, P. Albrecht // *Acta Virol.* – 1965. – Vol.9,№5. – P. 423-430.
103. Libikova, H. Viruses related to Kemerovo virus in *Ixodes ricinus* ticks in Czechoslovakia / H. Libikova, J. Rehacek, J. Somogyio // *Acta Virol.* – 1965. – Vol.9,№1. – P. 76–82.
104. Liu, J Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds / J. Liu, H. Xiao, F. Lei, Q. Zhu, K. Qin, X.W. Zhang, X.L. Zhang, D. Zhao, G. Wang, Y. Feng, J. Ma, W. Liu, J. Wang, G.F. Gao // *Science.* – 2005. – Vol.309,№5738. – P. 1206.
105. Lvov, D.K. "Okhotskiy" virus, a new arbovirus of the Kemerovo group isolated from *Ixodes (Ceratiixodes) putus* Pick.-Camb. 1878 in the Far East / D.K. Lvov, A.A. Timopheeva, V.L. Gromashevski, Y.M. Tsyarkin, O.V. Veselovskaya, G.V. Gostinshchikova, N.V. Khutoretskaya, A.G. Pogrebenko, V.A. Aristova, A.A. Sazonov, V.I. Chervonski, G.A. Sidorova, K.B. Fomina, V.Y. Zhezmer // *Arch Gesamte Virusforsch.* – 1973. – Vol.41,№3. – P. 160-164.
106. Maan, S. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses / S. Maan, S. Rao, N.S. Maan, S.J. Anthony, H. Attoui, A.R. Samuel, P.P.C. Mertens // *J Virol. Methods.* – 2007. – Vol.143,№2. – P. 132-139.
107. Main, A.J. Avalon and Clo Mor: two new Sakhalin group viruses from the North Atlantic / A.J. Main, W.G. Downs, R.E. Shope, R.C. Wallis // *J Med Entomol.* – 1976. – Vol.13. – P. 309–315.
108. Mardis, E.R. Next-generation sequencing platforms / E.R. Mardis // *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* – 2013. – Vol.6. – P. 287-303.
109. Martin, D.P. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes / D.P. Martin, B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal, B. Muhire // *Virus Evolution.* – 2015. – Vol.1,№1: vev003.
110. Marz, M. Challenges in RNA virus bioinformatics / M. Marz, N. Beerwinkler, C. Drosten, M. Fricke, D. Frishman, I.L. Hofacker, D. Hoffmann, M. Middendorf, T.

- Rattei, P.F. Stadler, A. Töpfer // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol.30,№13. – P. 1793–1799,
111. Maxam, A.M. A new method for sequencing DNA / A.M. Maxam, W. Gilbert // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1977. – Vol.74,№2. – P. 560-564.
112. Mitsuhashi, S. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer / S. Mitsuhashi, K. Kryukov, S. Nakagawa, J.S. Takeuchi, Y. Shiraishi, K. Asano, T. Imanishi // *Sci Rep*. – 2017. – Vol.7,№1. – P. 5657.
113. Morens, D.M. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases / D.M. Morens, G.K. Folkers, A.S. Fauci // *Nature*. – 2004. – Vol.430,№6996. – P. 242-249.
114. Mullis K. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction / K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. – 1986. – Vol.51,№1. – P. 263-273.
115. Naphthine, S. Characterization of the stop codon readthrough signal of Colorado tick fever virus segment 9 RNA / S. Naphthine, C. Yek, M.L. Powell, T.D. Brown, I. Brierley // *RNA*. – 2012. – Vol.18,№2. – P. 241-252.
116. Nei, M. *Molecular Evolution and Phylogenetics* / M. Nei, S. Kumar // Cambridge University Press. – 2001. – Vol.77,№1. – P. 117-120.
117. Nowrousian, M. Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems / M. Nowrousian // *Eukaryot Cell*. – 2010. – Vol.9,№9. – P. 1300-1310.
118. Nuttall, P.A. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface / P.A.Nuttall, M. Labuda // *Adv Virus Res*. – 2003. – Vol.60. – P. 233-272.
119. Nuttall, P.A. Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens / P.A. Nuttall, M. Labuda // *Ticks, biology, disease and control* / ed. by. A.D. Bowman and P.A. – , Cambridge : Cambridge University Press, 2008. – P. 205-219.
120. Nuttall, P.A. Tick-borne Viruses / P.A. Nuttall // *Biology of Ticks*, 2nd Edition / ed. by. D.E. Sonenshine and R.M. Roe. – Oxford : Oxford University Press, 2014. – P. 180-210.

121. O'Hara, R.S. Development of a mouse model system, coding assignments and identification of the genome segments controlling virulence of African horse sickness virus serotypes 3 and 8 / R.S. O'Hara, A.J. Meyer, J.N. Burroughs, L. Pullen, L.A. Martin // *Arch Virol Suppl.* – 1998. - №14. – P. 259–279.
122. Oker-Blom, N. Isolation of some viruses other than typical tick-borne encephalitis viruses from *Ixodes ricinus* ticks in Finland / N. Oker-Blom, A. Salminen, M. Brummer-Korvenkontio, L. Kaeaeriaeinen, P. Weckstroem // *Ann Med Exp Biol Fenn.* – 1964. – Vol.42. – P. 109-112.
123. Orbivirus: ViralZone [Электронный ресурс]. – URL: <https://viralzone.expasy.org/106> (дата обращения 13.03.2019).
124. Osborne, M.A. Single-molecule analysis of DNA immobilized on microspheres / M.A. Osborne, W.S. Furey, D. Klenerman, S. Balasubramanian // *Anal Chem.* – 2000. – Vol.72,№15. – P. 3678-3681.
125. Osterholm, M.T. Preparing for the next pandemic / M.T. Osterholm // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol.352,№18. – P. 1839-1842.
126. Owens, R.J. Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release / R.J. Owens, C. Limn, P. Roy // *J Virol.* – 2004. – №78. – P. 6649–6656.
127. Polonsky, J.A. Outbreak analytics: a developing data science for informing the response to emerging pathogens / J.A. Polonsky, A. Baidjoe, Z.N. Kamvar, A. Cori, K. Durski, W.J. Edmunds, R.M. Eggo, S. Funk, L. Kaiser, P. Keating, O.L.P. de Waroux, M. Marks, P. Moraga, O. Morgan, P. Nouvellet, R. Ratnayake, C.H. Roberts, J. Whitworth, T. Jombart // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2019. – Vol.374,№1776:e20180276.
128. Product description – TRI Reagent [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.mrcgene.com/wp-content/uploads/2014/06/TRIMarch2017.pdf> (дата обращения 09.08.2019)
129. Quillien, M.C. Avalon virus, Sakhalin group (Nairovirus, Bunyaviridae) from the seabird tick *Ixodes (Ceratiixodes) uriae* White 1852 in France / M.C. Quillien, J.Y.

- Monnat, G. Le Lay, F. Le Goff, E. Hardy, C. Chastel // *Acta Virol.* – 1986. – Vol.30,№5. – P. 418-427.
130. Radford, A.D. Application of next-generation sequencing technologies in virology / A.D. Radford, D. Chapman, L. Dixon, J. Chantrey, A.C. Darby, N. Hall // *J Gen Virol.* – 2012. – Vol.93,№9. – P. 1853-1868.
131. RNeasy Lipid Tissue Handbook [Электронный ресурс]. – URL: <http://mace.ihes.fr/data/protocol/1/RNeasy%20Lipid%20Tissue.pdf> (дата обращения 09.08.2019)
132. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1977. – Vol.74,№12. – P. 5463-5467.
133. Schmidt, J.R. Kemerovo virus from a migrating common redstart of Eurasia. (*Phoenicurus ochruros*, Ar1169) / J.R. Schmidt, R.E. Shope // *Acta Virol.* – 1971. – Vol.15,№1. – P.112.
134. Schneider, G.F. DNA sequencing with nanopores / G.F. Schneider, C. Dekker // *Nat Biotechnol.* – 2012. – Vol.30,№4. – P. 326-328.
135. Schoehn, G Structure of Broadhaven virus by cryoelectron microscopy: correlation of structural and antigenic properties of Broadhaven virus and bluetongue virus outer capsid proteins / G. Schoehn, S.R. Moss, P.A. Nuttall, E.A. Hewat // *Virology.* – 1997. – Vol.235,№2. – P. 191-200.
136. Sonenshine D.E. Tick-borne Rickettsioses II (*Anaplasmataceae*) / D.E. Sonenshine // *Biology of Ticks*, 2nd Edition / ed. by D.E. Sonenshine and R.M. Roe. – Oxford : Oxford University Press, 2014.
137. Stocsits, R.R. Multiple sequence alignments of partially coding nucleic acid sequences / R.R. Stocsits, I.L. Hofacker, C. Fried, P.F. Stadler // *BMC Bioinformatics.* – 2005. – Vol.6. – P. 160.
138. Tamura, K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol.28,№10. – P. 2731-2739.

139. Taxonomy Release History [Электронный ресурс]. – URL: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases (дата обращения 08.08.2019).
140. The ICTV Report: Online (10th) Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017 [Электронный ресурс]. – URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ (дата обращения 07.08.2019).
141. Thompson, J.F. Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system / J.F. Thompson, K.E Steinmann // *Curr Protoc Mol Biol.* – 2010. – №7. – P. 7.10.
142. Tihomirova, T.I. Localization and morphology of Kemerovo virus in tissue culture cells of continuous strain of human embryo skin muscle / T.I. Tihomirova // *Proc. 3-rd Europ. Reg. Cong. On Electron. Microscop. Prague.* – 1964. – P. 335.
143. Tkachev, S. First detection of Kemerovo virus in *Ixodes pavlovskyi* and *Ixodes persulcatus* ticks collected in Novosibirsk region, Russia / S. Tkachev, V. Panov, G. Dobler, N. Tikunova // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2014. – Vol.5, №5. – P. 494-496.
144. Tkachev, S.E. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in *Ixodes* ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan / S.E. Tkachev, A.Y. Tikunov, I.V. Babkin, N.N. Livanova, S.G. Livanov, V.V. Panov, V.V. Yakimenko, A.K. Tantsev, D.E. Taranenko, N.V. Tikunova // *Infect Genet Evol.* – 2017. - №47. – P. 56-63.
145. Tuittila, M.T. Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence / M.T. Tuittila, M.G. Santagati, M. Røyttä, J.A. Määttä, A.E. Hinkkanen // *J Virol.* – 2000. – Vol.74, №10. – P. 4579-4589.
146. Types of DNA sequencing: Sanger sequencing, whole genome shotgun sequencing, next-generation sequencing [Электронный ресурс]. – URL: <http://biology.reachingfordreams.com/biology/molecular-genetics/methods-in-molecular-genetics/21-types-of-dna-sequencing> (дата обращения 02.04.2019).

147. Vesenjak-Hirjan, J. Isolation of Bhanja virus from ticks in Yugoslavia / J. Vesenjak-Hirjan, C.H. Calisher, Z. Brudnjak, D. Tovornik, N. Skrtic, J.S. Lazuick // *Am J Trop Med Hyg.* – 1977. – Vol.26,№5,Pt1. – P. 1003-1008.
148. Webby, R.J. Are we ready for pandemic influenza? / Webby R.J. and Webster R.G. // *Science.* – 2003. – Vol.302,№5650. – P. 1519-1522.
149. Wick, R.R. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing / R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt // *Microb Genom.* – 2017. – Vol.3,№10 : e000132.
150. Zemla, J. Discussion In.: H. Libikova // J. Zemla // *Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex.* Prague. – 1962. – P. 117.

Приложение 1. Сравнительный анализ сегментов генома вируса Кемерово и представителей группы Грейт-Айленд

Вирус, штамм	Длина, п.н.	G+C состав, %	Белок	Длина белка, а.о.	Масса белка, кДа	Некодирующая часть сегмента с 5' конца, п.н.	Некодирующая часть сегмента с 3' конца, п.н.
1	2	3	4	5	6	7	8
Сегмент 1							
KEMV 61	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,091	10	31
KEMV k37	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,075	10	31
KEMV 101	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,202	10	31
KEMV R10	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	145,957	10	31
KEMV 5/1	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,106	10	31
KEMV L75	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	145,956	10	31
KEMV 205	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	145,902	10	31
KEMV 483	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	145,991	10	31
KEMV 106	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,094	10	31
KEMV k10	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,060	10	31
KEMV 21/10	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,050	10	31
KEMV EgAn-6169	3896	55	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,016	10	31
TRBV Tr35	3863*	56	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,545	.*	.*
TRBV Tr19	3863*	56	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,582	.*	.*
TRBV ref	3892	56	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,581	10	27
MUV Ix7-51	3892	55	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,777	10	27
MUVhay	3892	55	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,909	10	27
LIPV CzArLip_91	3892	56	VP1 (RdRp Pol)	1284	145,794	10	27
GIV CanAr 42	3897	56	VP1 (RdRp Pol)	1285	146,844	11	31

Продолжение примечания 1

1	2	3	4	5	6	7	8
Сегмент 2							
KEMV 61	2792	57	VP3 (T2)	908	102,803	18	50
KEMV k37	2792	57	VP3 (T2)	908	102,744	18	50
KEMV 101	2792	57	VP3 (T2)	908	102,746	18	50
KEMV R10	2792	57	VP3 (T2)	908	102,804	18	50
KEMV 5/1	2792	57	VP3 (T2)	908	102,718	18	50
KEMV L75	2792	57	VP3 (T2)	908	102,740	18	50
KEMV 205	2792	57	VP3 (T2)	908	102,745	18	50
KEMV 483	2792	57	VP3 (T2)	908	102,811	18	50
KEMV 106	2792	57	VP3 (T2)	908	102,786	18	50
KEMV k10	2792	57	VP3 (T2)	908	102,712	18	50
KEMV 21/10	2792	57	VP3 (T2)	908	102,730	18	50
KEMV EgAn-6169	2792	57	VP3 (T2)	908	102,746	18	50
TRBV Tr35	2752*	58	VP3 (T2)	908	102,618	-*	-*
TRBV Tr19	2752*	58	VP3 (T2)	908	102,639	-*	-*
TRBV ref	2793	58	VP3 (T2)	908	102,723	18	51
MUV Ix7-51	2793	56	VP3 (T2)	908	102,859	18	51
MUVhay	2793	57	VP3 (T2)	908	102,747	18	51
LIPV CzArLip_91	2793	57	VP3 (T2)	908	102,701	18	51
GIV CanAr 42	2794	58	VP2 (T2)	908	102,908	18	52
Сегмент 3							
KEMV 61	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,290	5	33
KEMV k37	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,345	5	33
KEMV 101	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,300	5	33
KEMV 5/1	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,565	5	33
KEMV L75	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,575	5	33
KEMV 205	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,525	5	33
KEMV 483	1934	55	VP4 (Cap)	632	72,493	5	33
KEMV 106	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,285	5	33
KEMV k10	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,357	5	33
KEMV 21/10	1934	56	VP4 (Cap)	632	72,300	5	33
KEMV EgAn-6169	1934	55	VP4 (Cap)	632	72,399	5	33
TRBV Tr35	1880*	55	VP4 (Cap)	620	71,151	-*	-*
TRBV Tr19	1882*	57	VP4 (Cap)	620	71,180	-*	-*
TRBV ref	1935	56	VP4 (Cap)	628	71,880	5	46
MUV Ix7-51	1935	56	VP4 (Cap)	628	72,038	5	46

Продолжение примечания 1

1	2	3	4	5	6	7	8
MUVhay	1937	56	VP4 (Cap)	628	72,063	5	48
GIV CanAr 42	1936	57	VP3(Cap)	635	72,812	5	26
Сегмент 4							
KEMV 61	1730	57	VP2	554	62,342	17	51
KEMV k37	1730	57	VP2	554	62,314	17	51
KEMV 101	1730	57	VP2	554	62,317	17	51
KEMV 5/1	1730	57	VP2	554	62,370	17	51
KEMV L75	1730	57	VP2	554	62,363	17	51
KEMV 205	1730	57	VP2	554	62,526	17	51
KEMV 483	1730	57	VP2	554	62,417	17	51
KEMV 106	1730	58	VP2	554	62,460	17	51
KEMV k10	1730	57	VP2	554	62,582	17	51
KEMV 21/10	1730	57	VP2	554	62,431	17	51
KEMV EgAn-6169	1730	56	VP2	554	62,532	17	51
TRBV Tr35	1657*	58	NS1	529	60,296	-*	-*
TRBV Tr19	1656*	57	NS1	529	60,389	-*	-*
TRBV ref	1734	56	NS1	529	60,443	42	105
MUV Ix7-51	1736	57	NS1	529	60,325	42	107
MUVhay	1736	57	NS1	529	60,135	42	107
GIV CanAr 42	1731	59	NS1	531	59,865	40	98
Сегмент 5							
KEMV 61	1720	59	NS1	529	59,981	40	93
KEMV k37	1719	59	NS1	529	60,055	39	93
KEMV 101	1719	59	NS1	529	60,042	39	93
KEMV 5/1	1719	59	NS1	529	60,046	39	93
KEMV L75	1719	59	NS1	529	60,151	39	93
KEMV 205	1719	59	NS1	529	60,140	39	93
KEMV 483	1719	59	NS1	529	60,081	39	93
KEMV 106	1719	59	NS1	529	60,042	39	93
KEMV k10	1718	58	NS1	529	60,040	38	93
KEMV 21/10	1719	59	NS1	529	59,972	39	93
KEMV EgAn-6169	1719	59	NS1	529	60,035	39	93
TRBV Tr35	1689*	57	VP2	553	61,981	-*	-*
TRBV Tr19	1686*	57	VP2	552	61,876	-*	-*
TRBV ref	1730	57	VP2	554	62,317	17	51
MUV Ix7-51	1729	56	VP2	553	62,556	18	52

Продолжение примечания 1

1	2	3	4	5	6	7	8
MUVhay	1729	56	VP2	553	62,522	18	52
GIV CanAr 42	1722	59	VP4	551	62,324	17	52
Сегмент 6							
KEMV 61	1667	57	VP5	537	59,459	22	34
KEMV k37	1667	57	VP5	537	59,353	22	34
KEMV 101	1667	57	VP5	537	59,379	22	34
KEMV 5/1	1667	57	VP5	537	59,426	22	34
KEMV L75	1667	57	VP5	537	59,411	22	34
KEMV 205	1667	57	VP5	537	59,370	22	34
KEMV 483	1667	57	VP5	537	59,457	22	34
KEMV 106	1667	57	VP5	537	59,427	22	34
KEMV k10	1667	57	VP5	537	59,430	22	34
KEMV 21/10	1667	57	VP5	537	59,368	22	34
KEMV EgAn-6169	1668	56	VP5	537	59,441	23	34
TRBV Tr35	1619*	57	VP5	535	59,419	-*	-*
TRBV Tr19	1620*	57	VP5	536	59,540	-*	-*
TRBV ref	1668	57	VP5	537	59,537	23	34
MUV Ix7-51	1668	58	VP5	537	59,382	23	34
MUVhay	1668	58	VP5	537	59,352	23	34
LIPV CzArLip_91	1509*	56	VP5	502	55,333	-*	-*
GIV CanAr 42	1666	59	VP5	537	59,509	20	35
Сегмент 7							
KEMV 61	1197	56	NS2	368	40,861	45	48
KEMV k37	1197	57	NS2	368	40,861	45	48
KEMV 101	1197	57	NS2	375	41,698	45	27
KEMV 5/1	1196	57	NS2	368	40,909	44	48
KEMV L75	1197	56	NS2	368	40,847	45	48
KEMV 205	1197	57	NS2	368	40,822	45	48
KEMV 483	1197	57	NS2	368	40,832	45	48
KEMV 106	1197	57	NS2	368	40,861	45	48
KEMV k10	1197	56	NS2	368	40,848	45	48
KEMV 21/10	1197	56	NS2	368	40,905	45	48
KEMV EgAn-6169	1197	56	NS2	368	40,933	45	48
TRBV Tr35	1143	56	NS2	368	41,016	-*	-*
TRBV Tr19	1143	56	NS2	368	41,018	-*	-*

Продолжение примечания 1

1	2	3	4	5	6	7	8
TRBV ref	1196	56	NS2	368	41,32	43	49
MUV Ix7-51	1196	57	NS2	368	41,056	43	49
MUVhay	1196	57	NS2	368	41,110	43	49
GIV CanAr 42	1181	59	VP7	357	39,641	17	93
Сегмент 8							
KEMV 61	1183	58	VP7	357	39,561	18	94
KEMV k37	1183	57	VP7	357	39,621	18	94
KEMV 101	1183	57	VP7	357	39,509	18	94
KEMV 5/1	1183	57	VP7	357	39,639	18	94
KEMV L75	1183	57	VP7	357	39,609	18	94
KEMV 205	1183	57	VP7	357	39,538	18	94
KEMV 483	1183	57	VP7	357	39,577	18	94
KEMV 106	1183	57	VP7	357	39,563	18	94
KEMV k10	1183	57	VP7	357	39,510	18	94
KEMV 21/10	1183	57	VP7	357	39,591	18	94
KEMV EgAn-6169	1183	58	VP7	357	39,506	18	94
TRBV Tr35	1106*	56	VP7	354	39,337	-*	-*
TRBV Tr19	1106*	57	VP7	354	39,363	-*	-*
TRBV ref	1184	57	VP7	357	39,636	18	95
MUV Ix7-51	1184	56	VP7	357	39,572	18	95
MUVhay	1184	56	VP7	357	39,657	18	95
GIV CanAr 42	1172	59	NS2	359	38,875	45	50
Сегмент 9							
KEMV 61	1049	54	VP6(Hel)	317	346324	58	40
KEMV k37	1049	54	VP6(Hel)	317	34,251	58	40
KEMV 101	1049	54	VP6(Hel)	317	34,192	58	40
KEMV 5/1	1049	55	VP6(Hel)	317	34,242	58	40
KEMV L75	1049	54	VP6(Hel)	317	34,328	58	40
KEMV 205	1049	54	VP6(Hel)	317	34,365	58	40
KEMV 483	1049	55	VP6(Hel)	317	34,177	58	40
KEMV 106	1049	54	VP6(Hel)	317	34,219	58	40
KEMV k10	1049	53	VP6(Hel)	317	34,338	58	40
KEMV 21/10	1049	54	VP6(Hel)	317	34,412	58	40
KEMV EgAn-6169	1049	54	VP6(Hel)	317	34,197	58	40
TRBV Tr35	974*	57	VP6(Hel)	312	33,475	-*	-*
TRBV Tr19	974*	56	VP6(Hel)	312	33,306	-*	-*

Продолжение примечания 1

1	2	3	4	5	6	7	8
TRBV ref	1034	55	VP6(Hel)	312	33,412	58	40
MUV Ix7-51	1034	56	VP6(Hel)	312	34,071	58	40
MUVhay	1034	55	VP6(Hel)	312	33,992	58	40
GIV CanAr 42	1056	58	VP6(Hel)	321	34,451	54	39
Сегмент 10							
KEMV 61	707	56	NS3	214	23,377	18	47
KEMV k37	707	56	NS3	214	23,353	18	47
KEMV 101	707	55	NS3	214	23,400	18	47
KEMV 5/1	707	56	NS3	214	23,409	18	47
KEMV L75	707	55	NS3	214	23,381	18	47
KEMV 205	707	56	NS3	214	23,399	18	47
KEMV 483	707	56	NS3	214	23,381	18	47
KEMV 106	707	56	NS3	214	23,399	18	47
KEMV k10	707	56	NS3	214	23,441	18	47
KEMV 21/10	707	55	NS3	214	23,400	18	47
KEMV EgAn-6169	707	55	NS3	214	23,409	18	47
TRBV Tr35	655*	58	NS3	210	22,785	-*	-*
TRBV Tr19	655*	58	NS3	210	22,891	-*	-*
TRBV ref	705	56	NS3	214	23,425	17	46
MUV Ix7-51	705	58	NS3	214	23,344	17	46
MUVhay	705	58	NS3	214	23,345	17	46
GIV CanAr 42	703	58	NS3	171	19,403	145	45

*Примечание: частичный сиквенс, некодирующие концевые фрагменты сегментов генома прочитаны не полностью

Приложение 2. Структура консервативных терминальных участков

Сегмент (белок)	Штамм	5' – конец	3' – конец
1	2	3	4
Сегмент 1 (VP1 RdRp)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV R10	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAU	GGAUAG – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	GGAUAG – 3'
Сегмент 2 (VP3)	KEMV 61	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV R10	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAC	GGAUAC – 3'
Сегмент 3 (VP4 Cap)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	ACUUAG – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	ACUUAC – 3'
Сегмент 4 (VP 2)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – CUAAAAU	AGAUAG – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'

1	2	3	4
Сегмент 5 (NS1 TuP)	KEMV 61	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAA	AGAUAG – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – CUAAAAA	AGAUAG – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
Сегмент 6 (VP5)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 101	5' – CUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV 106	5' – CUAAAAU	GGUUAG – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
Сегмент 7 (NS2 ViP)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	AGAUAG – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAU	AGAUAC – 3'
	KEMV k10	5' – GUCAAAU	AGAUAC – 3'
Сегмент 8 (VP7 T13)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	AGUUAG – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	GGUUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	AGUUAC – 3'
Сегмент 9 (VP6 Hel)	KEMV 61	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – CUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'

1	2	3	4
Сегмент 9 (VP6 Hel)	KEMV L75	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – CUAAAAA	AGAUAC – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAA	AGAUAC – 3'
Сегмент 10 (NS3)	KEMV 61	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 37	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 101	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 5/1	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV L75	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 205	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
	KEMV 483	5' – AUAAAAC	GGAUAC – 3'
	KEMV 106	5' – GUAAAAU	GGAUAG – 3'
	KEMV k10	5' – GUAAAAU	GGAUAC – 3'
Консенсус	Штаммы KEMV	5' – (A/G/C)U(A/C)AAA(A/U/C)	(A/G)(G/C)(A/U)UA(G/C) – 3'
	Группа GIV	5' – GUAAA(A/U)(A/U/C)	(A/G)(A/U/C)(C/G)(C/A/G)AC – 3'

Приложение 3. Нуклеотидная идентичность вирусов группы Грейт-Айленд по последовательности структурного белка VP1 РНК-зависимой РНК-полимеразы (в %)

Вирус, штамм		KEMV EgAr	KEMV 101	KEMV 5/1	KEMV L75	KEMV R10	KEMV 205	KEMV 106	KEMV k10	KEMV k37	KEMV 61	KEMV 21/10	KEMV 483	TRBV 35	TRBV 19	TRBV ref	LIPV CzAr Lip_91	MUV Ix7-S1	MUV MUV-hay
	№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
KEMV EgAr	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 101	2	94,71	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 5/1	3	95,10	95,15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV L75	4	95,15	95,15	98,15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV R10	5	95,33	95,43	98,28	99,69	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 205	6	95,28	94,61	94,84	95,02	95,23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 106	7	95,41	95,33	96,79	97,15	97,23	95,28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV k10	8	95,59	95,51	97,07	97,28	97,36	95,51	99,00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV k37	9	95,35	95,30	97,02	97,18	97,36	95,10	97,18	97,51	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 61	10	95,12	95,20	96,84	97,00	97,20	94,82	96,84	97,07	99,46	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 21/10	11	95,38	95,89	95,56	95,66	95,92	95,12	95,87	95,94	95,71	95,64	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 483	12	95,56	95,43	98,33	99,13	99,23	95,30	97,48	97,64	97,59	97,36	95,97	–	–	–	–	–	–	–
TRBV 35	13	69,54	69,67	69,44	69,64	69,52	69,10	69,08	69,31	69,16	69,21	69,57	69,59	–	–	–	–	–	–
TRBV 19	14	69,52	69,67	69,21	69,36	69,41	69,08	68,92	69,16	69,16	69,21	69,28	69,31	89,21	–	–	–	–	–
TRBV ref	15	69,77	70,13	69,75	69,90	69,82	69,59	69,57	69,59	69,46	69,52	70,13	69,69	93,27	88,87	–	–	–	–
LIPV CzAr Lip_91	16	70,00	70,36	70,16	70,34	70,26	69,90	69,72	69,93	69,75	69,82	70,26	70,26	93,22	88,31	95,30	–	–	–
MUV Ix7-S1	17	69,46	69,72	69,67	69,44	69,44	69,16	69,52	69,69	69,67	69,46	69,54	69,54	82,17	81,96	82,73	82,71	–	–
MUV MUV-hay	18	69,44	69,72	69,59	69,39	69,39	69,21	69,54	69,59	69,59	69,39	69,57	69,52	82,01	81,55	82,68	82,53	96,48	–
GIV	19	65,67	65,65	65,75	65,88	65,93	65,67	65,52	65,62	65,73	65,75	65,47	65,91	65,34	65,98	66,88	67,01	66,52	66,65

Приложение 4. Нуклеотидная идентичность вирусов группы Грейт-Айленд по последовательности структурного субкорового белка VP3 (T2) (в %)

Вирус, штамм		KEMV EgAr	KEMV 101	KEMV 5/1	KEMV L75	KEMV R10	KEMV 205	KEMV 106	KEMV k10	KEMV k37	KEMV 61	KEMV 21/10	KEMV 483	TRBV 35	TRBV 19	TRBV ref	LIPV	MUV Ix7-S1	MUV MUV-hay
	№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
KEMV EgAr	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 101	2	99,35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV5/1	3	98,50	98,46	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV L75	4	96,92	96,96	96,60	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV R10	5	97,21	97,24	96,88	99,53	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 205	6	97,10	97,21	96,81	96,81	97,10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 106	7	96,74	96,67	96,24	96,28	96,49	96,56	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV k10	8	96,81	96,74	96,45	96,42	96,56	96,70	98,93	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV k37	9	96,60	96,56	96,13	96,24	96,38	96,63	98,96	98,96	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 61	10	96,45	96,45	96,02	96,13	96,28	96,49	98,78	98,78	99,53	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 21/10	11	95,67	95,52	95,24	95,63	95,77	95,74	95,52	95,67	95,59	95,52	–	–	–	–	–	–	–	–
KEMV 483	12	95,74	95,74	95,31	95,20	95,45	95,74	95,63	95,70	95,52	95,49	94,91	–	–	–	–	–	–	–
TRBV 35	13	75,11	75,04	74,71	74,43	74,39	74,50	74,79	74,75	74,61	74,68	75,07	74,64	–	–	–	–	–	–
TRBV 19	14	75,11	75,04	74,71	74,50	74,46	74,61	74,79	74,75	74,68	74,68	75,07	74,64	98,62	–	–	–	–	–
TRBV ref	15	76,37	76,33	76,01	76,26	76,23	76,08	76,15	75,90	75,90	75,94	76,41	75,94	93,20	93,20	–	–	–	–
LIPV	16	76,44	76,37	76,26	76,08	76,05	76,08	76,15	76,05	75,98	76,01	76,30	76,08	91,80	91,69	93,09	–	–	–
MUV Ix7-S1	17	75,94	75,90	76,01	75,98	75,94	75,47	75,76	75,73	75,69	75,80	75,22	75,30	81,85	82,03	82,78	83,06	–	–
MUV MUV-hay	18	75,90	75,87	75,83	76,08	76,05	75,58	75,83	75,65	75,76	75,94	75,55	75,47	81,78	82,03	82,81	82,99	98,14	–
GIV	19	73,19	73,05	72,80	72,48	72,76	72,87	72,80	72,98	72,80	72,80	72,80	72,58	71,58	71,76	72,33	72,48	71,80	71,65