

На правах рукописи

**Дедков Владимир Георгиевич**

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВИРУСА КЕМЕРОВО НА  
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

14.02.02 – эпидемиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный руководитель:**

Кандидат медицинских наук

**Шипулин Герман Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор

**Рудаков Николай Викторович**

*директор ФБУН «Омский НИИ Природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора,*

доктор медицинских наук

**Дзагурова Тамара Казбековна**

*Заведующая лабораторией геморрагических лихорадок ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН*

**Ведущая организация** - Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «29» января 2016 г. в 10<sup>30</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.114.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (111123, Москва, Новогиреевская ул., д. 3а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте института [www.cgie@psr.ru](http://www.cgie@psr.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

**Горелов Александр Васильевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Проблема инфекций, передающихся клещами (ИПК), является чрезвычайно актуальной для большинства регионов Российской Федерации. Расширение ареалов переносчиков а также обнаружение новых возбудителей, способных существовать совместно в одном клеще, вызывая смешанную инфекцию, заставляют обратить пристальное внимание на данную проблему [Коренберг Э.И. и др., 2013г]. Так в 2014г обращаемость населения по поводу присасывания клеща составила 429636 случаев. Максимальные показатели обращаемости населения зарегистрированы в Томской (1413,90 на 100 тыс. населения), Тюменской (1150,29 на 100 тыс.) областях, Удмуртской Республике (1002 на 100 тыс.) и др.

По данным Д.К. Львова на территории Российской Федерации циркулирует более 50 видов арбовирусов [Львов Д.К. и др., 1989г]. Кроме того, на территории Российской Федерации расположены ареалы обитания представителей различных родов клещей, таких как *Ixodes*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemophysalis*, *Rhipicephalus*, выступающих переносчиками многих патогенных агентов вирусной и бактериальной природы, а так же и простейших микроорганизмов [Ревякин В.С. и др., 1989]. Совокупность данных фактов создает предпосылки к поддержанию высокого уровня заболеваемости ИПК, особенно среди населения из групп риска, в т.ч. тех, чья хозяйственная деятельность так или иначе связана с сельской и лесной местностью. Между тем в настоящее время регистрируется заболеваемость только по шести наиболее актуальным нозологиям, к которым относятся клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), лихорадка Крым-Конго (КГЛ) и клещевые риккетсиозы. Совокупная заболеваемость этих нозологий составляет чуть менее 2% от количества обращений по поводу присасывания клещей. Очевидно не всякое присасывание приводит к заболеванию. С другой стороны реальное количество присасываний должно быть существенно больше регистрируемого, особенно в удаленных от крупных городов районах. Таким образом остается неизвестным вклад в структуру инфекционной патологии прочих инфекционных агентов. Одним из таких агентов, эпидемиологическое значение которого изучено недостаточно, является представитель рода орбивирус – вирус Кемерово

Впервые вирус Кемерово был выделен из клещей вида *Ixodes persulcatus* и от больного человека в 1962г во время комплексной Советско-Чехословацкой экспедиции под руководством академика АМН СССР проф. М.П. Чумакова [Casals J., 1967]. В последующие годы родственные вирусу Кемерово арбовирусы были обнаружены и в других регионах СССР, а также в Чехословакии, Венгрии, Румынии, Египте, Индии, Канаде, Австралии, Перу, США из различных видов иксодовых и аргасовых клещей, крови млекопитающих и птиц. Вновь сформированная группа вирусов получила название «группа вируса Кемерово» [Vorden E.C. et al., 1971]. В последующее десятилетие было проведено изучение физико-химических, биологических и антигенных свойств как вируса Кемерово, так и родственных ему вирусов. Вместе с тем не были в достаточной степени изучены экологические аспекты циркуляции вирусов группы Кемерово и их роль в патологии человека. Это обстоятельство было обусловлено отсутствием в то время быстрых, доступных и чувствительных методов исследования. Проведение же широкомасштабных работ с применением традиционных вирусологических

методов было экономически неоправданно. Постепенно интерес исследователей к данной проблематике падал, и вирусы группы Кемерово перешли в разряд «забытых» инфекций.

Приведенные факты обусловили необходимость проведения настоящего исследования.

**Целью исследования** явилось изучение эпидемического потенциала вируса Кемерово и его генетических особенностей на территории Российской Федерации.

**Задачи исследования:**

1. Разработать методику выявления РНК вируса Кемерово методом ОТ-ПЦР в реальном времени на основе расшифровки генома штамма 21/10.
2. Представить молекулярно-генетическую характеристику вируса Кемерово и его взаимоотношений с другими родственными вирусами.
3. Изучить инфицированность иксодовых клещей - потенциальных переносчиков вируса Кемерово на различных территориях Российской Федерации.
4. Оценить этиологическую связь вируса Кемерово с лихорадочными состояниями, возникающими после присасывания клеща у лиц, проживающих на эндемичных территориях.

**Научная новизна работы**

1. Применение впервые разработанной методики определения РНК вируса Кемерово на основе расшифровки генома штамма 21/10 позволило выявить инфицированность переносчиков возбудителя на территории 10 регионов Российской Федерации, в том числе в ее Европейской части.
2. Впервые доказана возможность передачи вируса Кемерово посредством клещей вида *Dermacentor reticulatus*.
3. На основании впервые расшифрованных полных геномов вируса Кемерово, изолированного в России, и двух штаммов вируса Трибеч; проведено филогенетическое сравнение вируса Кемерово с другими представителями группы вирусов Грейт Айленд, что позволило подтвердить их близкое родство и общность происхождения.
4. Впервые показано явление реассортации среди вирусов, относящихся к группе Грейт Айленд, что свидетельствует об их способности к спонтанной изменчивости и способности образовывать гибриды с трудно прогнозируемыми базовыми эпидемиологическими характеристиками.

**Практическая значимость**

1. Разработанная на основе высокочувствительной и специфичной технологии ОТ-ПЦР в реальном времени методика определения РНК вируса Кемерово явилась основой создания диагностического набора реагентов, предназначенного для использования в рамках мониторинга природных очагов арбовирусных инфекций.
2. В результате работы общее количество генетической информации о вирусах, образующих группу Грейт Айленд, существенно возросло, что создало необходимую базу для проведения исследовательских работ по созданию новых диагностических наборов, предназначенных как для выявления РНК и антигенов, так и для выявления антител против вирусов группы Грейт Айленд в целях осуществления эпидемиологической диагностики.

3. Полученные в результате данной работы данные должны быть использованы для оптимизации эпидемиологического надзора за арбовирусными инфекциями.

#### **Личный вклад**

Автором в полном объеме самостоятельно были выполнены все запланированные виды эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований, включая их организацию, сбор первичных данных, обобщение, статистическую обработку и анализ с последующей оценкой полученных данных. При личном участии автора разработан дизайн исследования, разработаны методики секвенирования вируса Кемерово *de novo* и секвенирования вируса Трибеч. Кроме того автором лично разработана методика выявления РНК вируса Кемерово в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в реальном времени. По выполненной работе подготовлены публикации.

Часть исследований, посвященных изучению циркуляции вируса Кемерово, выполнена совместно с научными сотрудниками лаборатории эпидемиологи природно-очаговых инфекций ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Л.С. Карань и К.А. Гридневой при участии сотрудников ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»: д.б.н. Г. Г. Каргановой, к.б.н. А.П. Гмыль, к.б.н. Л.И. Козловской, к.б.н. Л.Ю. Романовой.

#### **Апробация работы**

Результаты исследований доложены на следующих конференциях:

- Международная научная конференция «Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами», посвященная 75-летию открытия вируса клещевого энцефалита, пос. Листвянка ИО, 2012
- Международная научная конференция «Актуальные проблемы клещевого энцефалита». Москва, 2013
- 9<sup>th</sup> Louis Pasteur Conference «Emerging Infectious Diseases», Paris, 2014
- 7<sup>th</sup> Annual Global Virus Network Meeting, China, 2015

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, в том числе 3 – в изданиях, поименованных в перечне ВАК РФ.

#### **Структура диссертации**

Диссертация представлена на 129 страницах, включает 39 рисунков, 16 таблиц, список литературы и 6 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных результатов, обсуждения полученных результатов с выводами. Список использованной литературы включает 25 отечественных и 57 зарубежных источников

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. Материалы и методы**

#### **1.1. Общая характеристика организации, материалов и методов исследования**

Первый этап исследования был посвящен оценке эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по инфекциям, передаваемым клещами на территории Российской Федерации. По данным форм Федерального а также отраслевого статистического наблюдения №№1 и 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», №2-13 «Сведения о деятельности лабораторий санитарно-гигиенического, микробиологического и паразитологического профиля федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – Центров гигиены и

эпидемиологии» изучена заболеваемость населения и ее структура на отдельных территориях Российской Федерации в период с момента введения обязательной регистрации выявляемых случаев до 2014 г. включительно.

С целью характеристики ситуации обобщены результаты мониторинга численности, видовой структуры и зараженности клещей-переносчиков, а также диагностики ИПК, полученные в рамках надзора за период с 2009 по 2014 гг. на изучаемых территориях. Данный фрагмент исследования выполнен совместно с Веригиной Е.В.

### **1.2. Расшифровка полного генома вируса Кемерово**

Для расшифровки полного генома вируса Кемерово был выбран штамм 21/10, изолированный Банновой Г.Г. в 1968г в Кемеровской области. Данный штамм является частью коллекции штаммов вируса Кемерово института Полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова.

С учетом особенностей молекулярно-генетической организации вируса Кемерово (двухцепочечная сегментированная РНК) была разработана методика секвенирования *de novo*, включающая этапы накопления вируса, удаление остаточного клеточного дэбриса, выделение дцРНК и удаление прочих нуклеиновых кислот, неспецифическую реакцию обратной транскрипции и амплификации, пошаговую расшифровку фрагментов генома, находящимися между известными участками а также этап секвенирования 5'-концов первичной нуклеотидной последовательности вируса.

### **1.3. Молекулярно-генетическая оценка взаимоотношений вируса Кемерово с другими вирусами группы Грейт-Айленд**

Для определения филогенетических отношений штамма вируса Кемерово 21/10 с другими представителями группы Грейт-Айленд секвенировали полные первичные нуклеотидные последовательности двух штаммов вируса Трибеч – Tr19 и Tr35, а также использовали сиквенсы всех представителей рода *Orbivirus*, депонированные в международной базе данных Gen Bank NCBI.

Филогенетический анализ проводили, сравнивая первичные нуклеотидные последовательности генов VP1 – VP10 штамма 21/10 вируса Кемерово с соответствующими первичными нуклеотидными последовательностями прочих представителей рода *Orbivirus*.

Выравнивание сиквенсов проводили с помощью программы CLUSTAL W. Филогенетический анализ проводили в оболочке MEGA 6.0 с использованием модели замен Джукс-Кантора (Jukes-Cantor substitution model). Филогенетические деревья строили по алгоритму присоединения соседа (neighbor-joining (NJ) tree algorithm).

### **1.4. Разработка методики выявления РНК вируса Кемерово на основе ОТ-ПЦР в реальном времени**

В качестве мишени для детекции определили наименее вариабельный участок генома вируса Кемерово на основании выравнивания референсных сиквенсов вируса Кемерово и сиквенсов VP1 штаммов из коллекции инситута Полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова

В системе, включающей обратную транскрипцию, в качестве положительного контроля использовали рекомбинантную РНК, упакованную в защитную белковую оболочку.

В качестве положительной контрольной последовательности был выбран фрагмент генома вируса Кемерово длиной 600 пар оснований.

Определение аналитической чувствительности проводили с помощью защищенного положительного контрольного образца в разведениях  $10^5$  (СОП1),  $10^4$  (СОП2) и  $10^3$  (СОП3) копий в мл.

Оценка аналитической специфичности диагностической системы проводилась посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих вирусов (представителей экологической группы арбовирусов, а также других патогенов) и организмов:

- - сем. *Reoviridae* 11 штаммов вируса Кемерово из коллекции института Полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (см. таб.4)
- - сем. *Reoviridae* (вирус Трибеч, штаммы Tr35 и Tr19)
- - сем. *Bunyaviridae* (вирус Тягиня, вирус Батаи, вирус Дхори, вирус крымской геморрагической лихорадки, вирус Инкоо,)
- - сем. *Togaviridae* (вирус Чикунгунья, вирус жёлтой лихорадки, вирус Синдбис, вирус лихорадки западного Нила, вирус клещевого энцефалита -10 штаммов, вирус краснухи)
- - сем. *Retroviridae* (вирус иммунодефицита человека)
- - Мышь (ДНК/РНК получена из тканей головного мозга)
- - Иксодовый клещ *Dermacentor marginatus*
- - Собака (ДНК/РНК получена из тканей головного мозга)
- - Кошка (ДНК/РНК получена из тканей головного мозга)
- -Человек – 100 образцов (ДНК/РНК получена из сывороток крови клинически здоровых людей)
- -Клещевые клеточные линии НАЕ/CTVM8 (*H. anatolicum anatolicum*) и IRE/CTVM19 (*I. ricinus*).

### 1.5. Молекулярно-генетическая оценка взаимоотношений вируса Кемерово с другими вирусами группы Грейт-Айленд

Полные геномы штаммов Tr35 и Tr19 секвенировали с использованием 26 пар праймеров. Дизайн праймеров осуществили на основании референсных сиквенсов сегментов вируса Трибеч (HQ266581 - HQ266590)

Сборку геномов осуществляли с помощью пакета специализированного программного обеспечения Lasergene 7.0 software (DNASTAR, Inc.). Первичные нуклеотидные последовательности штаммов вируса Трибеч Tr35 и Tr19 депонировали в GenBank NCBI под номерами KJ010798 - KJ010806, KJ574044 и KJ010789- KJ010789, KJ574045, соответственно.

Филогенетический анализ проводили, сравнивая первичные нуклеотидные последовательности генов VP1 – VP10 штамма 21/10 вируса Кемерово с соответствующими первичными нуклеотидными последовательностями прочих представителей рода *Orbivirus*.

Выравнивание сиквенсов проводили с помощью программы CLUSTAL W. Филогенетический анализ проводили в оболочке MEGA 6.0 с использованием модели замен Джукс-Кантора (Jukes-Cantor substitution model). Филогенетические деревья строили по алгоритму присоединения соседа (neighbor-joining (NJ) tree algorithm).

## **1.6. Изучение циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации**

В ходе исследования проведен анализ 3694 индивидуальных образцов имаго иксодовых клещей видов *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* и *Dermacentor nuttalli*. Сбор образцов производился в период 2005-2013гг в весенне-летний период во время плановых мониторинговых исследований. География образцов представлена 12 регионами Российской Федерации, расположенными в 5 из 8 федеральных округов, включающих территорию Европейской части России, Урал и Западную Сибирь.

Исследование зараженности иксодовых клещей вирусом Кемерово проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с помощью разработанного набора для детекции РНК вируса Кемерово КЕМV-FL (ФБУН ЦНИИЭ).. Реакцию проводили с помощью приборов для ПЦР в реальном времени Rotor Gene Q и Rotor Gene 3000 (Qiagen). Статистическую обработку полученных результатов и их графическое отображение осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Office 2007. Расчет средней ошибки проводили по формуле:

$$Sp = \sqrt{\frac{p(100-p)}{N-1}},$$

где Sp – средняя ошибка относительной величины (средняя ошибка определения зараженности клещей), p – относительная величина (зараженность клещей), N – количество наблюдений (исследованных образцов).

## **1.7. Получение протяженного фрагмента первичной нуклеотидной последовательности вируса Кемерово**

Для получения протяженных фрагментов генома вируса Кемерово предварительно обогащали и неспецифически амплифицировали исходный материал. Амплификацию протяженного фрагмента проводили при помощи двух пар специфических праймеров, с помощью которых получили два ампликона, нуклеотидные последовательности которых перекрываясь, позволили собрать фрагмент первичной нуклеотидной последовательности гена полимеразы VP1 вируса Кемерово.

Построение филодендрограммы проводили с помощью программы Mega 6.0 методом присоединения соседа и количеством бутстреп-повторов, равным 1000.

## **1.8. Оценка наличия сероконверсии у лиц с лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща**

Оценку наличия сероконверсии у лиц с лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща, проводили на территории Алтайского края. Сбор материала проводили на базе ИКБ №5 г. Барнаул в весенне-осенний период 2013-2014гг. У пациентов с лихорадочным синдромом, сыпью, неврологическими нарушениями, и зафиксированным фактом присасывания клеща отбирали первую порцию крови сразу при поступлении. Вторую порцию крови отбирали при выписке (через 7-14 дней). Отбор крови проводили в пробирки, содержащие ЭДТА. После инкубации 2-3 часа при 37°С отбирали плазму и переносили в отдельные 1,5 мкл пробирки. Далее материал замораживали и хранили при -20°С для дальнейшего исследования. Всего был собран материал от



162 пациентов. При наличии у пациентов элементов сыпи брали биоптат из элемента сыпи.

Собранный материал исследовали молекулярными методами для выявления генетических маркеров следующих инфекционных агентов: риккетсий группы пятнистой лихорадки, вируса клещевого энцефалита, вируса Кемерово, *Borrelia burgdorferi*, *Ehlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*. Исследования проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL, набора реагентов для детекции РНК вируса Кемерово, а также праймеров и зонда для детекции возбудителей пятнистых лихорадок.

При выявлении возбудителя и с учетом клинических проявлений у пациентов образцы исключали из рассмотрения. В результате были отобраны 17 пар сывороток от больных, для которых не удалось получить лабораторно подтвержденный диагноз. Эти сыворотки исследовали в реакции нейтрализации с вирусом Кемерово (штамм 21/10).

Достоверность каждого опыта подтверждали проведением отрицательных контрольных реакций между неинфицированной культурой клеток и отрицательной сывороткой, а также инфицированной вирусом культуры клеток и отрицательной сывороткой.

## 2. Результаты исследования

### 2.1. Заболеваемость населения инфекциями, передаваемыми клещами и ее структура на отдельных территориях Российской Федерации

С развитием методов и средств лабораторной диагностики, а также внедрением их практику надзора в Российской Федерации увеличивается не только число расшифрованных случаев инфекций, переносимых клещами, но и количество самих нозологий. Так, статистическое наблюдение за КВЭ в масштабах страны проводится с 1939 г., за ИКБ – с 1992 г. Начиная с 2013 г. список ИПК, регистрируемых на федеральном уровне, с учетом накопленных знаний об эпидемиологии «новых» инфекций расширен и дополнительно включены омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ), астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ), ГАЧ и МЭЧ. В настоящее время в структуре ИПК, преобладают ИКБ, КВЭ, а также клещевые риккетсиозы, среди которых наибольшей эпидемиологической значимостью обладает СКТ.

По данным статистической отчетности, среднегодовой показатель заболеваемости ИКБ в целом по стране в период с 2001 по 2014 гг. составил  $5,4 \pm 0,19$  случаев на 100 тыс. населения, а динамика характеризовалась относительной стабильностью.

Заболеваемость КВЭ, занимающая второе место по частоте регистрируемых в Российской Федерации случаев среди ИПК, составила в среднем  $2,58 \pm 0,22$  случаев на 100 тыс. населения. Многолетняя динамика характеризовалась снижением со скоростью  $0,18^0/0000$  в год, которое исследователи объясняют рядом причин, среди которых ведущая роль отводится естественным колебаниям численности переносчиков, снижению вирусной активности, наблюдаемой в природных очагах инфекции, а также реализации комплекса профилактических мероприятий, включающих вакцинацию населения и массовые акарицидные обработки.

Третье место по частоте заболеваемости занимал СКТ, заболеваемость которым составила  $1,3 \pm 0,09$  на 100 тыс. населения в год, что связано с характерным для данной инфекции более узким ареалом распространения, ограниченными территориями Западной, Центральной и Восточной Сибири и Дальнего Востока.

Структура заболеваемости ИПК, согласно многочисленным исследованиям, проведенным на различных территориях страны, имеет региональные отличия. В этой связи она изучалась нами на отдельных территориях Российской Федерации – в Центральной части (Московская, Ярославская и Костромская области), на Северо-Западе (Вологодская область), в Поволжье (Удмуртская Республика), на Урале (Свердловская и Курганская области), а также в Сибири (Омская область, Алтайский край, Кемеровская область, Республика Тыва, Иркутская область).

Расчеты суммарного показателя заболеваемости ИПК позволили провести ранжирование территорий по уровням заболеваемости. Так, к территориям с высокими уровнями заболеваемости отнесены Республика Тыва, Вологодская область и Алтайский край. Высокий рейтинг Республики Тыва связан с регистрацией высоких уровней заболеваемости всеми инфекциями, кроме МЭЧ и ГАЧ. В Алтайском крае он обусловлен высокой заболеваемостью СКТ, а в Вологодской области, на территории которой регистрировались МЭЧ и ГАЧ, – высокой заболеваемостью ИКБ (Рис.1).

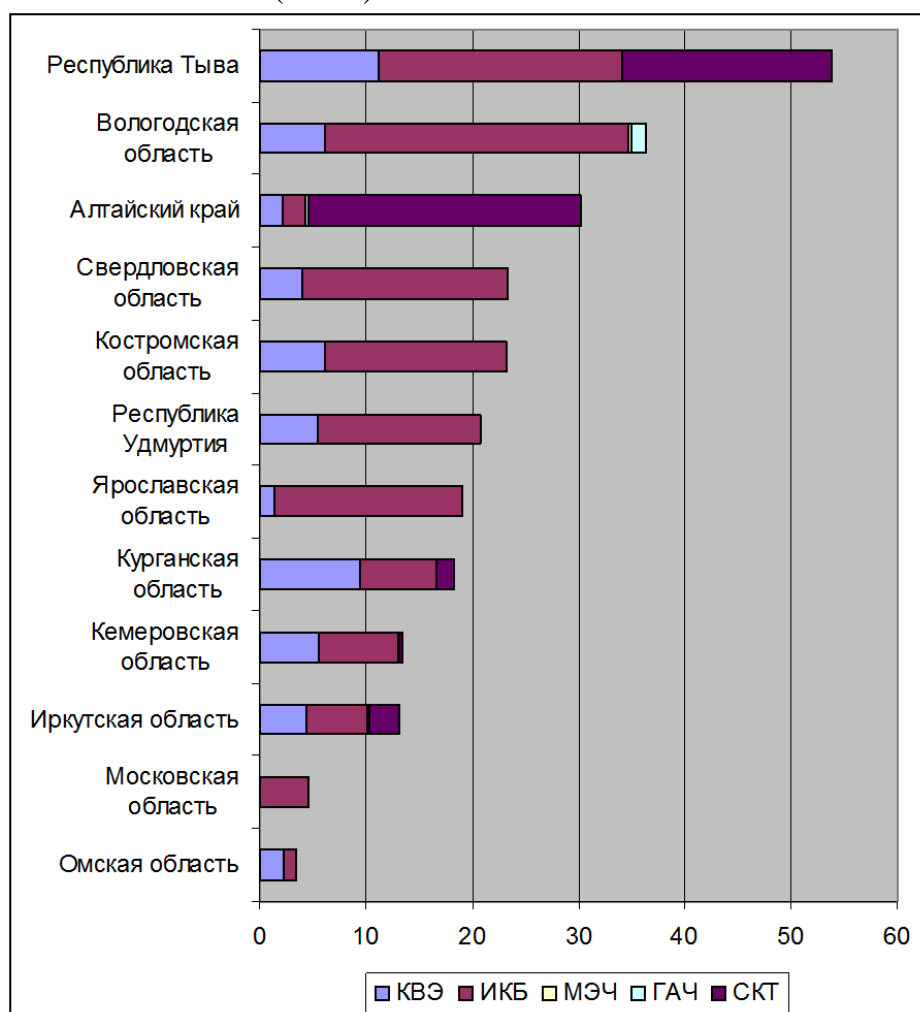


Рисунок 1. Уровни и структура заболеваемости ИПК в некоторых субъектах Российской Федерации (среднемноголетние данные за 2009-2014 гг., показатели на 100 тыс.).

В группу с показателями суммарной заболеваемости выше среднего включены Свердловская и Костромская области, Удмуртская Республика, Ярославская и Курганская области. Их рейтинговые позиции определялись соответствующими уровнями заболеваемости ИКБ (Свердловская и Ярославская области) или ИКБ и КВЭ (Костромская область и Республика Удмуртия). В Курганской области регистрировалась высокая заболеваемость КВЭ, превышающая среднюю по Российской Федерации более чем в 4 раза.

В группу со средними показателями ИПК вошли два субъекта, на территориях которых регистрируются все (Иркутская область) или все, кроме ГАЧ, рассматриваемые ИПК (Кемеровская область). Остальные два субъекта – Московская и Омская области отнесены к территориям с заболеваемостью ниже среднего – здесь регистрировались только КВЭ и ИКБ.

В последние годы, благодаря совершенствованию информационного обеспечения надзора за ИПК, для оценки ситуации используют показатель обращаемости населения по поводу присасывания клещей. Результаты анализа обращаемости на изученных территориях позволили выявить ее различия и разделить субъекты условно на четыре группы (Рис. 2).

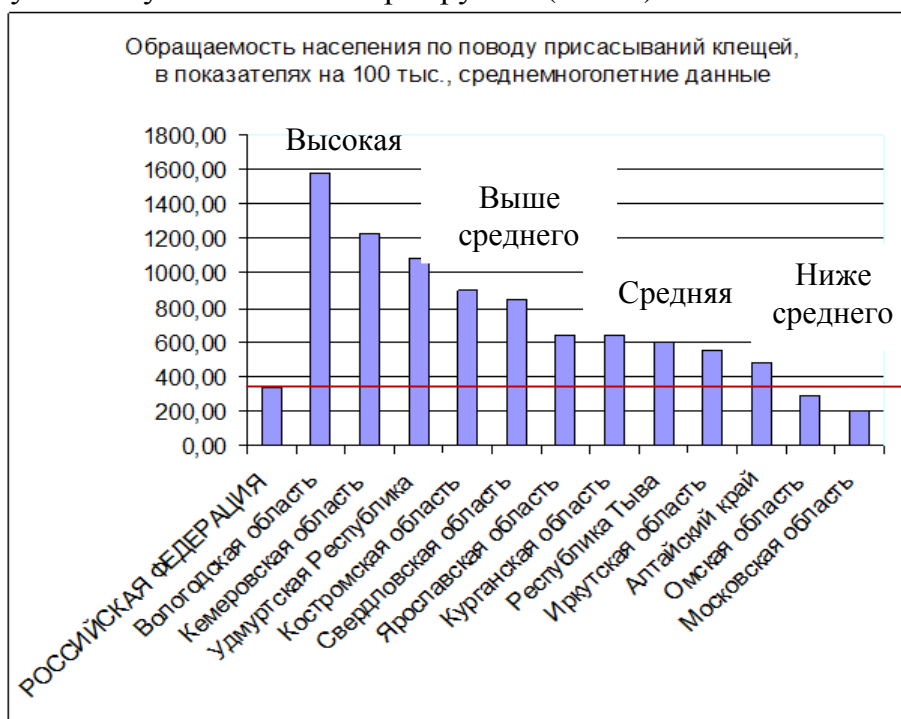


Рисунок 2. Обращаемость населения по поводу присасывания клещей на некоторых территориях Российской Федерации (показатели на 100 тыс., среднемноголетние данные за 2011-2014 гг.).

К группе с высокими показателями обращаемости, а, следовательно, высоким риском заражения ИПК, отнесены Вологодская и Кемеровская области, к группе с показателями выше среднего – Удмуртская Республика, Костромская и Свердловская области. Большинство территорий отнесены к группе со средней обращаемостью (Ярославская, Курганская области, Республика Тыва, Иркутская область и Алтайский край) На территориях Омской и Московской областей была выявлена самая низкая обращаемость населения.

При сравнении показателей заболеваемости ИПК и обращаемости населения установлено, что далеко не всегда высокая обращаемость соответствует высоким

уровням заболеваемости, и наоборот. Так, например, на территориях Республики Тыва и Алтайского края, для которых характерна высокая заболеваемость, обращаемость населения была на среднем уровне. Это свидетельствует либо о недостатках в информировании населения о рисках заражения ИПК, либо о недостаточном качестве диагностика.

### 3.2. Диагностика ИПК как основа эпидемиологического надзора

#### 3.2.1. Мониторинг численности, видовой структуры и зараженности переносчиков.

Энтомолого-микробиологический мониторинг является неотъемлемой составной частью надзора за ИПК. Существующие возможности информационного обеспечения надзора позволяют получать, обобщать и систематизировать данные о заселенности клещами природных станций, видовом составе переносчиков, а также их инфицированности. Указанные показатели обладают несомненной прогностической ценностью, но собираются лишь на отдельных территориях страны (табл. 1, 2).

Таблица 1. Заселенность клещами природных станций по данным дозорного надзора (среднесезонная численность р. *Ixodes*, флагов/км).

Субъекты РФ	Годы						Средне-многолетн. показатель
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
Удмуртская Республика	18,8	16,5	20,1	24,2	н/д	н/д	19,9
Свердловская область	2,4	1,8	2	1,4	1,1	2,3	1,8
Республика Тыва	15,5	н/д	19,7	8	24,4	н/д	16,9
Омская область	н/д	н/д	н/д	1,7	2,8	1,6	2,0

Таблица 2. Видовой состав клещей в некоторых субъектах Российской Федерации по данным дозорного надзора (среднемноголетние данные, %)

Виды клещей	Субъекты Российской Федерации			
	Республика Тыва	Республика Алтай	Иркутская область	Омская область
<i>I.persulcatus</i>	18,9	28,9	61,2	12,1
<i>D.reticulatus</i>	0	0	0	87,9
<i>D.nutalli</i>	81,1	63,6	38,7	0
<i>H.concinna</i>	0	7,5	0	0

Суммирование результатов изучения инфицированности клещей с применением всех методов диагностических исследований показало, что минимальные результаты получены по Республике Тыва, Омской, Курганской, Костромской и Московской областям (Рис.3).

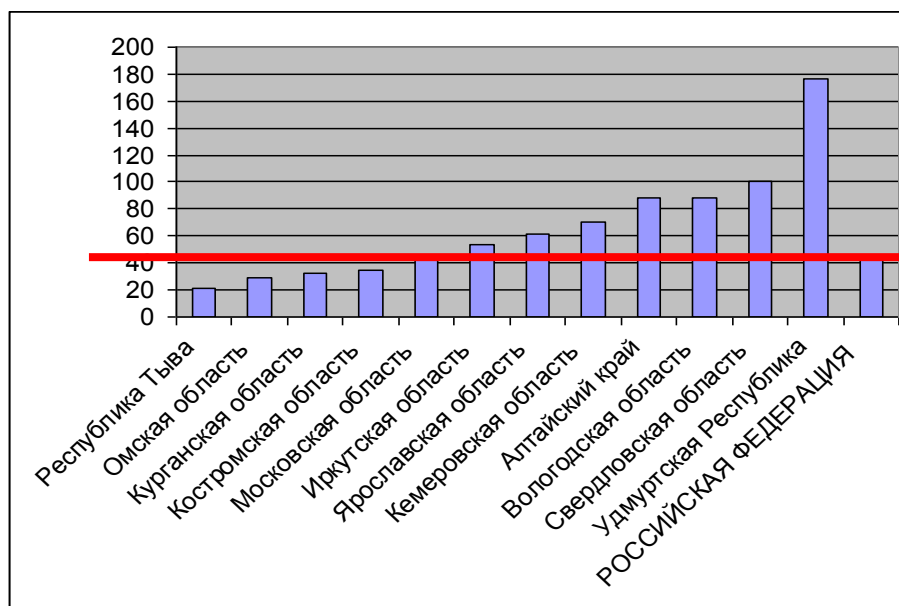


Рисунок 3. Распределение суммарного показателя инфицированности клещей по отдельным территориям Российской Федерации (среднеголетние данные, учитывающие результаты положительных находок при исследовании различными методами).

Полученные результаты свидетельствуют о недостаточном качестве диагностики на территориях, характеризующихся неблагополучием (Республике Тыва, Курганская и Костромская области). При этом большинство положительных находок связано с ПЦР-диагностикой, частота применения которой значительно различалась на изучаемых территориях ( $p \leq 0,05$ ).

Так, за период 2012-2014 гг. в Республике Тыва на ИКБ методом ПЦР исследовано всего 17 клещей. Для сравнения на соседней территории Алтайского края за тот же период проведено 921 ПЦР-исследование на ИКБ и 8479 исследований на КВЭ, из которых ПЦР-метод составил 8%. Обобщенные результаты ПЦР-диагностики представлены на Рис. 4.

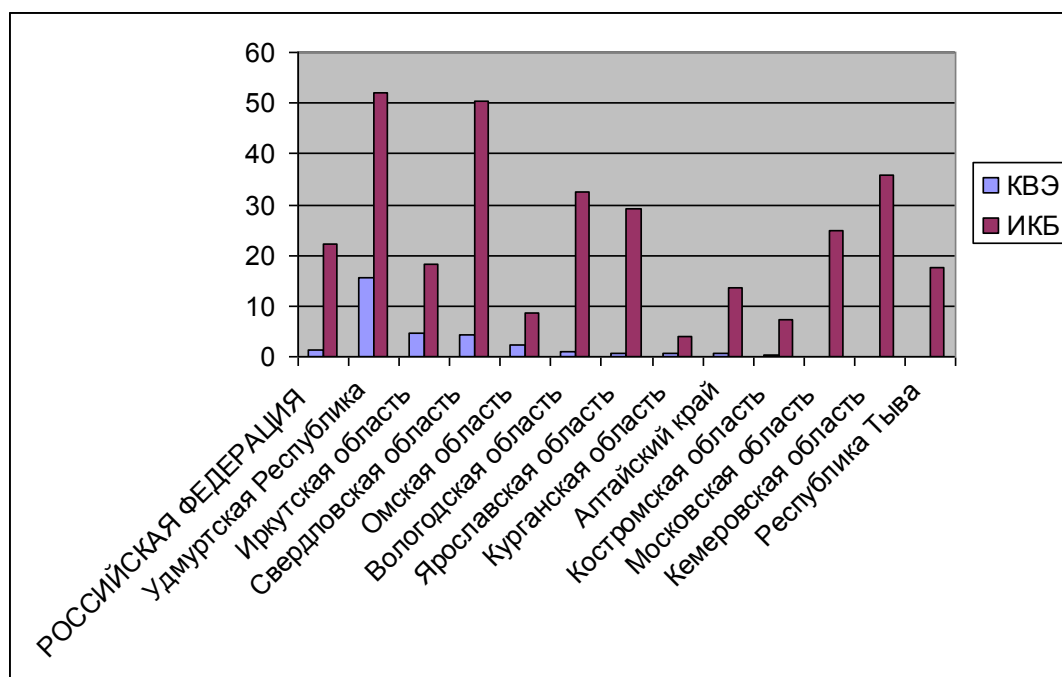


Рисунок 4. Инфицированность клещей, собранных из внешней среды, ВКЭ и боррелиями по результатам ПЦР-диагностики.

В среднем по стране ПЦР-методом ежегодно исследуется в среднем  $25060 \pm 4846$  клещей, положительные находки ВКЭ составляют  $1,37\% \pm 0,33\%$ . Наиболее широко этот метод диагностики КВЭ используется в лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора в Вологодской и Ярославской областях –  $1509 \pm 494$  и  $3759 \pm 1466$  исследований клещей соответственно. Максимальная инфицированность клещей выявлена также в Удмуртской Республике –  $15,54\% \pm 4,56\%$ , Иркутской области –  $4,5\% \pm 1,1\%$ , Свердловской области –  $4,43 \pm 2,16\%$ .

Для выявления ИКБ в клещах молекулярно-генетические методы применяются чаще. В среднем по стране ежегодно исследуется  $67850 \pm 10313$  экземпляров клещей. На изучаемых территориях при исследовании этим методом максимальная инфицированность клещей боррелиями выявлялась в Удмуртской Республике  $52,08\% \pm 8,17\%$ , в Свердловской области –  $50,24\% \pm 2,26\%$ , Кемеровской области –  $35,68\% \pm 2,46\%$ , Вологодской области –  $32,36\% \pm 2,43\%$ .

### 3.2.2. Диагностика ИПК среди населения

Уровни регистрируемой заболеваемости населения, также как и инфицированность переносчиков зависят от качества лабораторной диагностики, а именно, диагностической ценности применяемых в рамках надзора методов, а также объема проводимых исследований. В связи с этим мы изучили состояние диагностики ИПК на различных территориях страны.

Установлено, что в настоящее время диагностика ИПК среди населения осуществляется с применением серологических и молекулярно-генетических методов. В среднем в Российской Федерации ежегодно в ФБУЗ ЦГиЭ по субъектам обследовалось на КВЭ серологическими методами более 25000 человек, наличие антител выявляется в  $22,43\%$  сывороток, антиген выявляется в  $4,18\%$  сывороток.

На изучаемых территориях наибольшие объемы исследований проводились в Свердловской области – 2257 сывороток в год, положительными на наличие антител оказались  $62,08\%$  проб, в Удмуртской Республике – 1316 сывороток ( $21,23\%$ ), в Алтайском крае – 973 сыворотки ( $14,54\%$ ).

Молекулярно-генетические методы для диагностики КВЭ применяются в меньших объемах. Ежегодно исследуется  $840 \pm 241$  образец биологического материала от людей, положительные результаты выявляются в  $2,27\% \pm 1\%$ . Среди изучаемых территорий диагностика указанными методами осуществлялась в Ярославской, Вологодской, Курганской, Свердловской, Омской областях, Удмуртской Республике, Алтайском крае. Наибольшие объемы исследований проводились в Вологодской области – в среднем  $42,5 \pm 7$  исследований в год, при этом положительных результатов за исследуемый период зарегистрировано не было. В Удмуртской Республике проводилось от 13 до 73 исследований ежегодно, положительные результаты обнаруживались в  $1,4-7,9\%$  случаев.

Количество серологических исследований, проводимых среди населения на наличие антител к возбудителям ИКБ, осуществлялись в объеме 32700 ежегодно. Положительные результаты обнаруживались в  $14,47\%$  случаев. Наибольшее количество исследований проводилось в Удмуртской Республике – 1267

исследований в год (17,76% положительных проб), Ярославской области – 923 исследования (16,96%), Свердловской области – 875 исследований (21,62%).

Молекулярно-генетические исследования на ИКБ проводятся в количестве  $563 \pm 146$  в год, положительные результаты выявляются в  $3,55 \pm 1,87\%$ . Наибольшие объемы исследований зарегистрированы в Вологодской области –  $83 \pm 14$  в год (было обнаружено по 1 положительной находке в 2011 и 2014 гг.).

Диагностика СКТ среди населения в ФБУЗ ЦГиЭ в субъектах Российской Федерации осуществляется серологическими методами. В целом по стране проводится 1477 исследований в год, в 18% случаев обнаруживаются антитела к риккетсиям. Диагностика проводилась в Курганской, Свердловской, Иркутской, Кемеровской областях, Республике Тыва, Алтайском крае. В Алтайском крае производится наибольшее количество исследований – 365 в год, доля положительных находок составляет 31,67%.

Учет диагностики МЭЧ и ГАЧ среди людей был введен с 2011 года, на два года раньше введения официальной регистрации заболеваемости по этим нозологиям. По данным последних четырех лет, в ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации на МЭЧ было исследовано  $2103 \pm 482$  сыворотки от людей, из них положительными оказались  $1,61 \pm 0,6\%$ . Ежегодно исследования на МЭЧ проводятся в Вологодской, Омской областях и Алтайском крае, среднее количество исследований составляет  $59 \pm 19$ ,  $156 \pm 111$ ,  $100 \pm 27$  исследований в год. На ГАЧ было исследовано  $3047 \pm 333$  сыворотки –  $6,59 \pm 3,4$  положительных.

Таким образом, изучение эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по ИПК на ряде территорий Российской Федерации показало различия в уровнях и структуре регистрируемой заболеваемости, обращаемости населения по поводу присасывания клещей, а также качестве диагностике инфекций, как среди переносчиков, так и среди людей. Полученные результаты учитывались для выбора территорий с целью последующего изучения циркуляции вируса Кемерово.

#### **4. Разработка методики выявления РНК вируса Кемерово методом ОТ-ПЦР в реальном времени на основе расшифровки генома штамма 21/10**

##### **4.1. Результаты расшифровки полного генома вируса Кемерово**

В результате сборки установлено, что геном вируса Кемерово (подобно другим представителям рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*) представлен сегментированной РНК (дцРНК), формирующей 10 сегментов различной длины. Общий размер генома составляет около 20 т.п.о. Полноразмерные последовательности десяти сегментов штамма 21/10 вируса Кемерово были аннотированы и депонированы в международной базе данных GenBank NCBI под номерами KC288130 - KC288139.

Таким образом, нами впервые определена первичная нуклеотидная последовательность полного генома вируса Кемерово штамм 21/10, изолированного на территории Кемеровской области в 1968г. Генетическая информация, полученная в результате этой работы, послужила основой для последующего молекулярно-генетического анализа взаимоотношений вируса Кемерово с другими вирусами группы Грейт-Айленд и способствовала созданию методики определения РНК вируса Кемерово на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени.

#### **4.2. Характеристика методики выявления РНК вируса Кемерово на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени**

Для выявления РНК вируса Кемерово в качестве мишени выбрали фрагмент гена полимеразы (VP1) длиной 116 пар оснований (позиции 2861-2976 в референсных сиквенсах вируса Кемерово HM543481 и KC288130).

Измерениями показано, что аналитическая чувствительность диагностической системы для определения РНК вируса Кемерово методом ОТ-ПЦР в реальном времени составила  $10^3$  копий (ГЭ) рекомбинантного защищенного контроля в мл, что является хорошим показателем для систем подобного рода.

При оценке аналитической специфичности диагностической системы тестирование не выявило ложноположительных реакций (в том числе и с близкородственным вирусом Трибеч). При этом, все образцы, содержащие РНК 11 различных штаммов вируса Кемерово, были определены как положительные.

Таким образом, установлено, что диагностическая тест-система обладает высокой специфичностью, в том числе и в отношении близкородственных вирусов.

#### **5. Молекулярно-генетическая оценка взаимоотношений вируса Кемерово с другими вирусами группы Грейт-Айленд**

Основные молекулярно-генетические характеристики штамма KEMV 21/10, полученные в результате сравнительного анализа, представлены в сравнении с имеющимися в международной базе данных GenBank NCBI структурами полных геномов вирусов KEMV штамм Eg-Ar-61-69 (HQ266591-HQ266600), TRBV (HQ266581-HQ266590) и GIV (NC\_014522-NC\_014531), см. таб.5.

Установлено, что, как и у прочих орбивирусов, геном штамма 21/10 представлен десятью сегментами, длины которых варьируют от 3896 п.о. (seg.1) до 707 п.о. (seg.10). Длины сегментов штаммов Кемерово 21/10 и Eg-Ar-61-69 полностью совпадают, тогда как длины соответствующих сегментов вирусов Трибеч и Грейт-Айленд несколько отличаются. Так, штамм вируса Трибеч имеет более длинные, по сравнению с вирусом Кемерово, сегменты 2, 3, 4, 5, 6 и 8, а вирус Грейт-Айленд – сегменты 1, 2, 3, 4, 5 и 9. По количеству кодируемых аминокислотных остатков штаммы вируса Кемерово 21/10 и Eg-Ar-61-69 также идентичны друг другу и превосходят по длине сегменты 1,3 и 9 вируса Трибеч и сегменты 4, 7, 9, 10 вируса Грейт-Айленд. В сегментах 3, 5, 6, 8 штаммы вируса Кемерово уступают вирусу Грейт-Айленд по количеству кодируемых аминокислотных остатков.

Длина и структура консервативных концевых фрагментов штаммов вируса Кемерово 21/10, Eg-Ar-61-69 и вируса Трибеч сходны, в то время как у вируса Грейт-Айленд на 5'- конце сегмента 1 в шестой позиции имеется замена А/Т, а на 3'- конце лишь последние три нуклеотидных остатка являются консервативными и идентичны таковым у вирусов Кемерово и Трибеч. Длины некодирующих 5'- и 3'- областей идентичны для штаммов вируса Кемерово и существенно отличаются от соответствующих областей вирусов Трибеч и Грейт-Айленд. Все сравниваемые вирусы в сегменте 3 имеют открытую рамку считывания в пятой позиции.

Существенных отличий (G+C) состава геномов сравниваемых вирусов выявлено не было.

Таким образом, данные сравнительного анализа основных молекулярно-генетических характеристик указывают на безусловную принадлежность к одному



виду Кемерово штаммов 21/10 и Eg-Ag-61-69, а также на близкое родство с вирусом Трибеч и на родственные связи с вирусом Грейт-Айленд.

Парное сравнение первичной нуклеотидной последовательности VP1 (ген полимеразы) штамма 21/10 с соответствующими первичными нуклеотидными последовательностями представителей группы Грейт-Айленд показало 72% идентичность со всеми штаммами вируса Трибеч и со штаммом вируса Липовник, 68% идентичность с вирусом Грейт-Айленд и 95% идентичность со штаммом вируса Кемерово Eg-Ag-61-69, изолированного в Египте.

Парное сравнение первичной нуклеотидной последовательности VP3 штамма 21/10 с соответствующими первичными нуклеотидными последовательностями представителей группы Грейт-Айленд показало 76% идентичность со всеми штаммами вируса Трибеч и со штаммом вируса Липовник, 74% идентичность с вирусом Грейт-Айленд и 96% идентичность со штаммом вируса Кемерово Eg-Ag-61-69 (Табл. 3).

Таблица 3. Данные парного сравнения идентичности первичных нуклеотидных последовательностей VP1-VP10 штамма KEMV 21/10 с соответствующими последовательностями вирусов группы Грейт-Айленд

Вид/штамм	VP1 (RdRp)	VP3 (T2)	KEMV 21/10	KEMV 21/10
	GenBank номера доступа	GenBank номера доступа	VP1 нуклеотидная идентичность, %	VP3 нуклеотидная идентичность, %
TRBV_ref	HQ266581.1	HQ266582.1	72	76
TRBV_Tr35	KJ010806.1	KJ010805.1	72	76
TRBV_Tr19	KJ010797.1	KJ010796.1	72	76
LIPV_CzArLip_91	HM543475.1	HM543476.1	72	76
KEMV ref	HQ266591.1	HQ266592.1	95	96
GIV	NC_014522	NC_014524	68	74

Филогенетические деревья, построенные на основании первичных нуклеотидных последовательностей прочих сегментов, имеют сходную топологию, что указывает на отсутствие реассортации штамма KEMV 21/10 с другими представителями группы Грейт-Айленд (Рис. 5).

Таким образом, установлена однозначная принадлежность штамма 21/10 к виду Кемерово входящему, в свою очередь, в группу вирусов Грейт-Айленд, и его близкое родство со штаммами вирусов Трибеч Tr19 и Tr35. Мы не выявили явление реассортации штамма 21/10 вируса Кемерово с вирусами Трибеч и Липовник. Однако следует отметить, что изоляция данных штаммов происходила в разное время и на значительно удаленных друг от друга территориях. Поэтому данное исследование является лишь одномоментным срезом, охватывающим небольшую выборку геномов, и не позволяет однозначно установить наличие, либо отсутствие феномена реассортации для вируса Кемерово. С учетом же соображений общего характера, основанных на сходности биологических свойств орбивирусов, а также с учетом обнаруженного феномена реассортации для штаммов вируса Трибеч, вероятность существования подобного феномена и у вируса Кемерово является очень высокой.

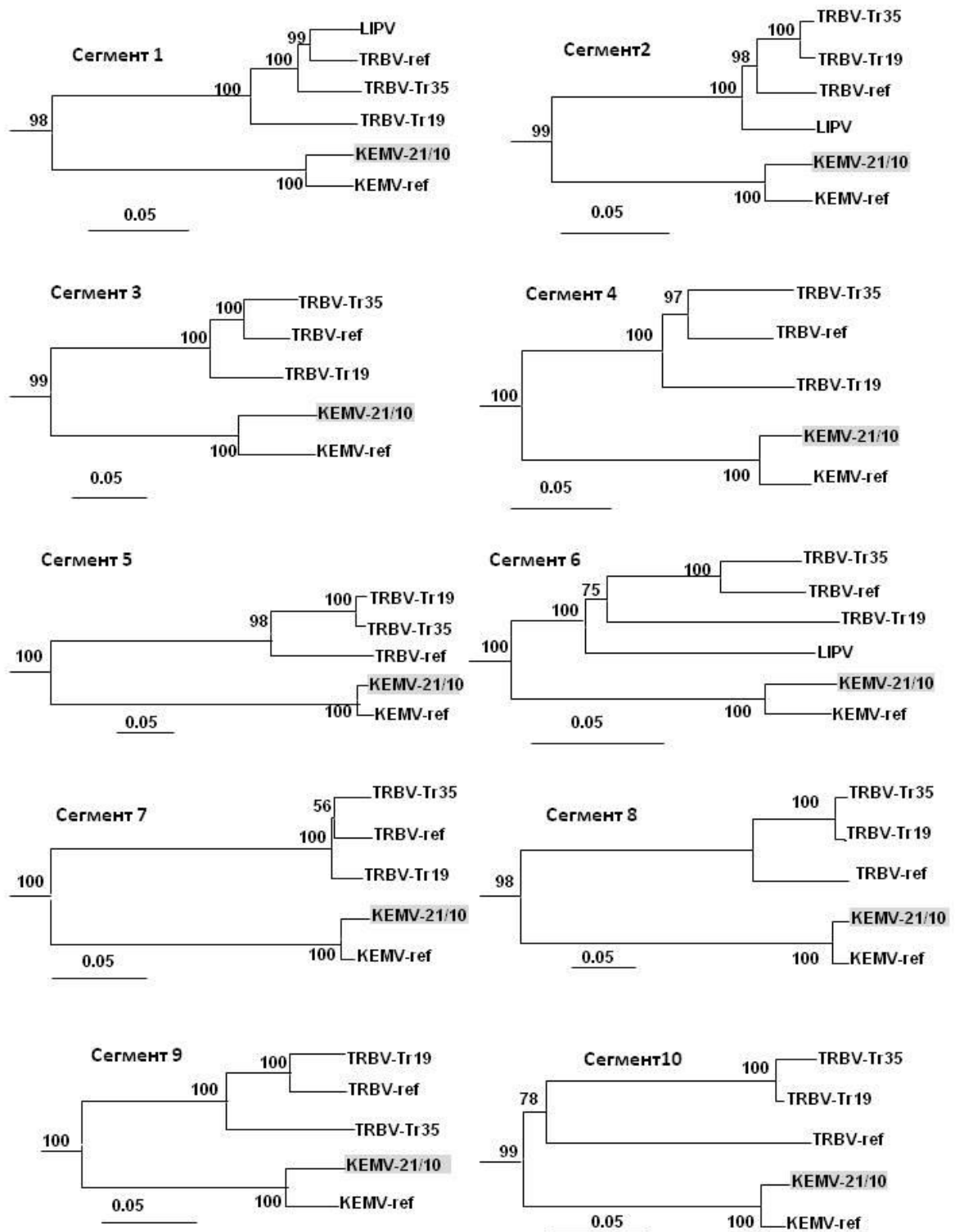


Рисунок 5. Филогенетические деревья группы Грейт-Айленд, построенные на основании первичных нуклеотидных последовательностей VP1-VP10. Филогенетический анализ проведен с использованием статистической модели замен Джукса-Кантора. Дерево построено с использованием алгоритма NJ. Статистическая достоверность топологии установлена за счет 1000 бутстрэп-повторов. Последовательности генома вируса Грейт-Айленд выбраны в качестве аут-группы

## 6. Изучение циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации

### 6.1. Результаты исследования зараженности иксодовых клещей вирусом Кемерово

На территориях 12 субъектов Российской Федерации исследованы 3694 клеща. Большая часть переносчиков относилась к *I. persulcatus* (68%). Они выявлены на всех территориях, кроме субъектов Центрального Федерального округа, где собраны клещи *I. ricinus*. На территории Курганской области исследованы только *D. reticulatus*, а в Республике Тыва - *D. nuttalli*.

Максимальной зараженностью по средним значениям характеризовались клещи вида *D. reticulatus* (5,8%) Средняя зараженность *I. persulcatus* и *I. ricinus* составила 4,2 и 4,3% соответственно. Причем, зараженность *I. persulcatus* значительно варьировалась на разных территориях – от 0,2% в Республике Удмуртия (Приволжский Федеральный округ) до 10,1% в Вологодской области (Северо-Западный Федеральный округ). На территории Кемеровской области возбудитель в переносчиках выделен в 5,8%.

Таким образом исследование территории Российской Федерации, охватившее 5 из 8 Федеральных округов, показало наличие широкой циркуляции возбудителя. Инфицированность клещей *I. persulcatus* вирусом Кемерово варьировала от нуля в Республике Тыва до 10,1% в Вологодской области. Инфицированность клещей вида *I. ricinus* варьировала от нуля в Ярославской области до 4,9% в Московской области. Инфицированность клещей вида *D. reticulatus* в Курганской области составила 4,1%, а инфицированность клещей вида *D. nuttalli* в Республике Тыва равнялась нулю (Рис.6).

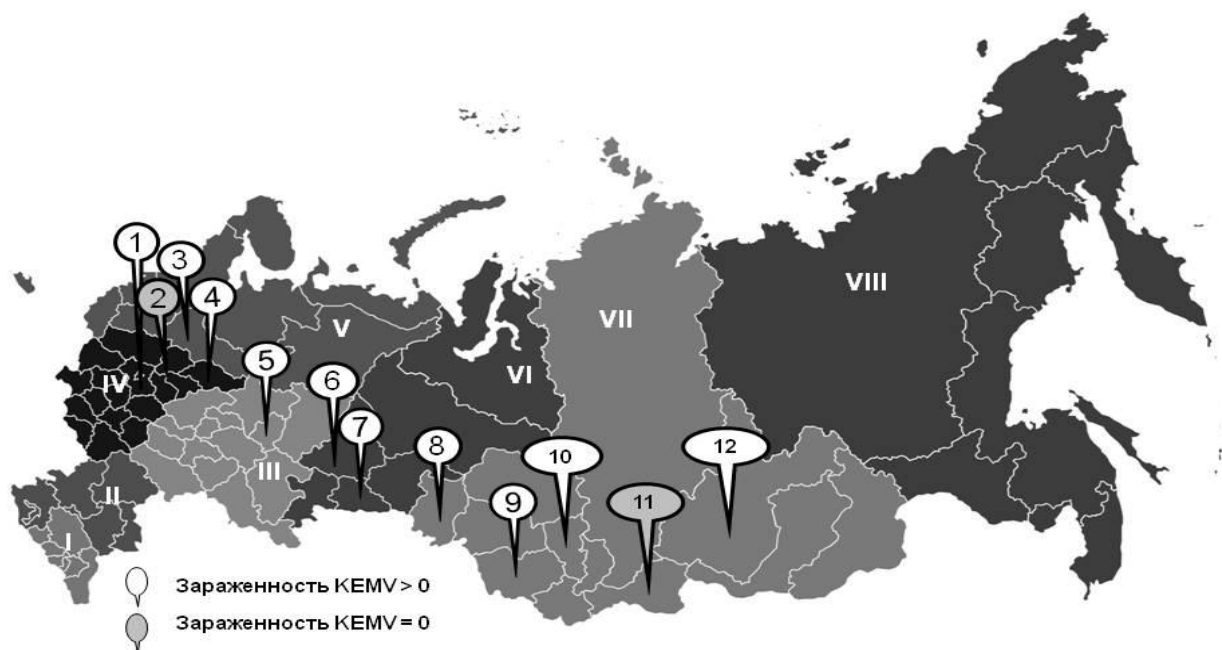


Рисунок 6. Территории циркуляции вируса Кемерово в Российской Федерации (Федеральные округа: I – Северо-Кавказский, II – Южный, III – Приволжский, IV – Центральный, V – Северо-Западный, VI - Уральский, VII – Сибирский, VIII – Дальневосточный; Области: 1 – Московская., 2 – Ярославская, 3 - Вологодская, 4 - Костромская, 5 – Республика Удмуртия, 6- Свердловская, 7-Курганская, 8- Омская, 9 – Алтайский край, 10- Кемеровская, 11- Республика Тыва, 12 – Иркутская).

Таким образом, инфицированность клещей в исследованных регионах имела достоверные различия ( $p < 0,05$ ) причины неравномерного территориального распределения которой требуют дальнейшего изучения.

## 6.2. Валидизация полученных результатов

Для подтверждения отсутствия кросс-контаминации лабораторными штаммами вируса Кемерово и для исключения неспецифических реакций проводили выборочное секвенирование ампликонов положительных ПЦР-проб. Для улучшения качества секвенирования ампликоны предварительно клонировали в вектор pGem-T (Promega) по стандартному протоколу и секвенировали индивидуальные колонии, содержащие вставку ожидаемого размера (116 пар оснований).

Полученные сиквенсы анализировали с помощью программы BioEdit 7.2.5 (Ibis Biosciences). Результат сравнения полученных сиквенсов и последовательностей референсных и музейных штаммов представлен на рис. 32.

Сравнение таргетных областей референсных сиквенсов HM543481, KC288130 (штамм 21/10) установлена их 97% гомология на нуклеотидном уровне. Выявлены одиночные нуклеотидные вариации (Т/С), (С/Т) и (С/А) в позициях 2890 н.т., 2924 н.т. и 2935 н.т., соответственно. Анализ штаммов вируса Кемерово из коллекции института Полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова показал разброс по идентичности в таргетной области с референсным штаммом HM543481 в диапазоне 97 - 99%, а с референсным штаммом KC288130 (штамм 21/10) в диапазоне 95 - 98%.

Таким образом, идентичность с референсным штаммом HM543481 в среднем на 1 - 2% выше, чем с референсным штаммом KC288130 (штамм 21/10).

Сравнительный анализ выборочно секвенированных положительных образцов показал их совпадение с референсным сиквенсом HM543481 в 96-99% и с референсным сиквенсом KC288130 (штамм 21/10) в 95-99%.

Первичные нуклеотидные последовательности имели высокую степень идентичности как с сиквенсами референсных штаммов HM543481 и KC288130 (штамм 21/10), так с сиквенсами штаммов из коллекции института Полиомиелита и вирусных энцефалитов, а также друг с другом. Это обстоятельство позволило однозначно интерпретировать принадлежность полученных сиквенсов к структуре вируса Кемерово. Наличие единичных замен в различных позициях для сиквенсов положительных образцов. Позволило сделать вывод об отсутствии кросс-контаминации материалом лабораторных штаммов вируса Кемерово.

В ходе исследования 134-х клещевых суспензий имаго *I. persulcatus*, собранных в Заринском районе Алтайского края, в трех образцах было выявлено наличие РНК вируса Кемерово, что составило  $2.2 \pm 1,3\%$  от общего количества исследованных проб. В результате обогащения, неспецифической амплификации и последующей амплификации со специфическими праймерами из одного образца получен фрагмент гена полимеразы вируса Кемерово длиной 805 пар оснований, названный Vrn-101-13. Первичная нуклеотидная последовательность фрагмента гена полимеразы изолята Vrn-101-13 на 96% идентична аналогичному фрагменту референсного сиквенса штамма 21/10 (KC288130), изолированного в 1968 г. в Кемеровской области из клеща *I. persulcatus*.

По данным филогенетического анализа полученная последовательность Brn-101-13 находится в одной кладе как с последовательностью референсного штамма вируса Кемерово, так и с последовательностями близкородственных вирусов Трибеч и Липовник.

Таким образом, в результате нашего исследования была оценена зараженность вирусом Кемерово иксодовых клещей из 12 регионов, расположенных в пяти федеральных округах Российской Федерации. Зараженность вирусом варьировала от 0.2% до 10.1%. Отсутствие положительных образцов среди клещей, собранных на территориях Республики Тыва и Ярославской области, вероятно, является результатом малой выборки, либо неспособностью вируса Кемерово инфицировать клещей вида *D. nuttalli*. Косвенным подтверждением этого предположения служит наличие инфицированных клещей в соседних Московской, Костромской и Вологодской областях.

### **6.3. Оценка наличия сероконверсии у лиц с лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща**

При лабораторном исследовании сывороток от больных с лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща, удалось выявить этиологический агент в 145 случаях из 162. При этом большая часть случаев ИПК – 81%, пришлась на СКТ.

В 11% случаев этиологический агент выявлен не был. Данные сыворотки исследовались в реакции нейтрализации с вирусом Кемерово. В результате исследования сывороток с нейтрализующей активностью выявлено не было. Однако наши результаты не могут считаться окончательными, так как мы исследовали биологический материал от пациентов, у которых наблюдались только лихорадочные симптомы и не исследовали пациентов с неврологической симптоматикой. Кроме того, сам объем выборки был невелик. Поэтому следует считать вопрос о патогенности вируса Кемерово открытым и требующим дальнейшего изучения.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработана методика выявления РНК вируса Кемерово в формате ОТ-ПЦР в реальном времени, обладающая аналитической чувствительностью  $10^3$  ГЭ/мл и высокой специфичностью.
2. Применение разработанной методики выявления РНК вируса Кемерово в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для исследования суспензий клещей, собранных в 12 регионах Российской Федерации в период 2005-20013 гг., позволило выявить 10 регионов циркуляции вируса Кемерово, расположенных в 5 из 8 федеральных округов Российской Федерации. Полученные данные свидетельствуют о широком распространении вируса Кемерово не только на территории Западной Сибири, как считалось ранее, но и на территории Урала и Европейской части России.
3. Выявлено присутствие вируса Кемерово в трех видах иксодовых клещей – *I. persulcatus*, *I. ricinus* и *D. reticulatus*, при этом в *D. reticulatus* впервые. Полученные данные свидетельствуют о большом разнообразии возможных переносчиков вируса Кемерово в природе и возможном существовании очагов симпатрической циркуляции вируса Кемерово и родственных ему вирусов группы Грейт Айленд.

4. При обследовании 162 пациентов инфекционного стационара, проживающих на эндемичной территории, не удалось выявить этиологическую связь между вирусом Кемерово и лихорадочными состояниями, возникающими после присасывания клеща.
5. Впервые проведена полная расшифровка генома вируса Кемерово, штамм 21/10, изолированного в западной Сибири, и двух геномов близкородственного вируса Трибеч (штаммы Tr19 и Tr35), изолированных на территории южной Украины.
6. В ходе сравнительного генетического анализа показана принадлежность вируса Кемерово, штамм 21/10 к группе вируса Грейт-Айленд и его близкородственная связь со штаммами вируса Трибеч, изолированными на территории восточной Европы.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. С целью совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического контроля за ИПК необходимо мониторировать циркуляцию вируса Кемерово и родственных ему вирусов группы Грейт Айленд на территории Российской Федерации
2. Для решения вопроса о возможном вкладе данных инфекционных агентов в формирование заболеваемости ИПК неясной этиологии необходимо проводить исследование материала от больных с менинго-энцефалитами и лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща при отсутствии лабораторно подтвержденных диагнозов ВКЭ, ОГЛ, СКТ, ГАЧ, МЭЧ, КГЛ, АПЛ.
3. Для решения вопроса о возможности изменения базовых эпидемиологических характеристик необходимо проводить работу по получению новых изолятов вируса Кемерово и изучению их биологических свойств.

### **Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Дедков В.Г., Маркелов М.Л., Войцеховская Я.А., Карганова Г.Г., Гмыль А.П., Козловская Л.И., Пиванова Г.П., Шипулин Г.А. Разработка тест-системы для определения РНК вируса Кемерово в формате ПЦР в реальном времени. Эпидемиология и инфекционные болезни. Акт. Вопросы, 2012, №3, 38-41
2. Дедков В.Г., Девяткин А.А., Бекова М.В., Маркелов М.Л., Бесхлебова О.В., Гранитов В.М., Шпынов С.Н., Гмыль А.П., Шипулин Г.А.. Обнаружение вируса Кемерово в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных в Алтайском крае. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 6(79), 2014, 46-50.
3. Dedkov V.G., Markelov M.L., Gridneva K.A., Bekova M.V., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Romanova L.Iu., Pogodina V.V., Yakimenko V.V., Shipulin G.A. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. Ticks Tick Borne Dis. 2014. Jul 26
4. Dedkov V.G., Dubina D.A., Yurchenko O.A., Bekova M.V., Valdokhina A.V., Shipulin G.A, Characterization of two strains of Tribeč virus isolated in Ukraine. Vector borne and zoonotic diseases, 11/2014; 14(11):808-16.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИПК – инфекции, переносимые клещами  
КВЭ – клещевой вирусный энцефалит  
ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека  
МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека  
КГЛ – лихорадка Крым-Конго  
ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз  
ОГЛ – омская геморрагическая лихорадка  
СКТ – сыпной клещевой тиф  
АПЛ – астраханская пятнистая лихорадка  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
SISPA - Sequence-Independent Single Primer Amplification  
ДМСО - диметилсульфоксид  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
кДНК – комплементарная ДНК  
ЛИС – лабораторная информационная система  
дцРНК – двухцепочечная РНК  
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция  
ВНQ-1 - black hole quencher1  
ПКО – положительный контрольный образец  
СОП – стандартный образец предприятия  
ОКО – отрицательный контрольный образец  
ВКО – внутренний контрольный образец  
дНТФ – дезоксинуклео-трифосфаты  
NJ - neighbor-joining tree algorithm  
JCM - Jukes-Cantor substitution model  
ФБУЗ ЦГиЭ – Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения Центр гигиены и эпидемиологии  
ГЭ – геном эквивалент  
РНКаза – фермент РНК гидролаза  
ДНКаза – фермент ДНК гидролаза  
СДС – лаурилсульфат натрия  
ДТТ – дитиотритол  
PEG – полиэтиленгликоль  
IPTG - Изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид  
RACE - Rapid Amplification of cDNA Ends  
X-Gal - 5-Бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид  
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусной кислота  
FBS – fetal bovine serum

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» д.б.н. Каргановой Галине Григорьевне, к.б.н. Гмыль Анатолию Петровичу, к.б.н. Козловской Любови Игоревне, д.м.н., проф. Погодиной Ванде Вацлавовне, к.б.н. Романовой Лидии Юрьевне, сотрудникам Алтайского государственного медицинского университета д.м.н., проф. Гранитову Владимиру Михайловичу и Бесхлебовой Ольге Васильевне, сотруднику ГУ НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи д.м.н. Шпынову Станиславу Николаевичу, а также сотрудникам ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора: к.б.н. Маркелову Михаилу Леонидовичу, Карань Людмиле Станиславовне, д.б.н., проф. Твороговой Марии Глебовне, за научно-практическую помощь в проведении исследований, а также за многочисленные ценные советы по интерпретации и оформлению полученных результатов.

Особую благодарность автор выражает академику РАН, д.м.н., профессору Покровскому Валентину Ивановичу и академику РАН, д.м.н., профессору Покровскому Вадиму Валентиновичу за ряд консультаций и критических замечаний по теме диссертационной работы.