
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Вакалова Е.В.^{1,4,5}, Бутенко А.М.², Вишневская Т.В.², Дорофеева Т.Е.², Гительман А.К.², Куликова Л.Н.³, Львов Д.К.², Альховский С.В.²

Результаты обследования клещей в дельте Волги (Астраханская область, 2017 год) на вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, *ССНФV*) и другие клещевые арбовирусы

¹ ФКУЗ «Астраханская противочумная станция» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав и благополучия человека Российской Федерации, 414024, г. Астрахань, Россия;

² Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

³ ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав и благополучия человека Российской Федерации, 414057, г. Астрахань, Россия;

⁴ Научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, 414011, г. Астрахань, Россия;

⁵ ГБУЗ Астраханской области «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», 414011, г. Астрахань, Россия

Введение. В дельте Волги (Астраханская область) расположены активные природные очаги Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), основным переносчиком которой служат клещи *Hyalomma marginatum*. Также здесь выявлена активная циркуляция вируса Дхори (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*). Вместе с тем, можно предположить, что в дельте Волги возможна циркуляция и других клещевых арбовирусов. В частности тех, которые циркулируют в соседних регионах и переносятся клещами *Hyalomma* spp. и *Dermacentor* spp., таких как вирусы Бханджа (*Phlebovirus: Phenuiviridae*), Вад Медани (*Orbivirus: Reoviridae*) и Тамды (*Orthonairovirus: Nairoviridae*).

Цель работы – исследование иксодовых клещей, распространённых в дельте Волги, на наличие клещевых арбовирусов, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани, и Тамды.

Материал и методы. Использовали молекулярно-генетические методы выявления и анализа нуклеиновых кислот (ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ).

Результаты и обсуждение. В 2017 г. заражённость клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в дельте Волги составила 1,98 и 0,4% соответственно. Результаты генетического анализа показали, что циркулирующая здесь популяция вируса Дхори гомогенна (99–100% по гену М) и формирует отдельный генетический кластер, для которого вирус Баткен (антигенный вариант вируса Дхори) из Средней Азии является ближайшей внешней группой. В то же время вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды в клещах *H. marginatum* и *D. marginatus*, распространённых в данном регионе, не выявлено.

Заключение. Вирус Дхори активно циркулирует в природных очагах ККГЛ в дельте Волги. Впервые получены количественные показатели соотношения заражённости вирусами ККГЛ и Дхори клещей *H. marginatum*.

Ключевые слова: клещевые арбовирусы; Крымская-Конго геморрагическая лихорадка; вирус Дхори; *Hyalomma marginatum*; *Dermacentor marginatus*.

Для цитирования: Вакалова Е.В., Бутенко А.М., Вишневская Т.В., Дорофеева Т.Е., Гительман А.К., Куликова Л.Н., Львов Д.К., Альховский С.В. Результаты обследования клещей в дельте Волги (Астраханская область, 2017 год) на вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, *ССНФV*) и другие клещевые арбовирусы. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5). 221-228

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-221-228>

Информация об авторах:

Вакалова Е.В. <https://orcid.org/0000-0001-6121-5900>

Бутенко А.М., <https://orcid.org/0000-0001-6152-5685>

Вишневская Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-6963-8681>

Дорофеева Т.Е., <https://orcid.org/0000-0001-8846-0092>

Гительман А.К., <https://orcid.org/0000-0002-8410-2332>

Куликова Л.Н., <https://orcid.org/0000-0003-3066-3430>

Львов Д.К., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Альховский С.В., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>

Для корреспонденции: Альховский Сергей Владимирович, д-р биол. наук, руководитель лаборатории биотехнологии Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>. E-mail: salkh@ya.ru; s_alkhovsky@gamaleya.org

Vakalova E.V.^{1,4,5}, Butenko A.M.², Vishnevskaya T.V.², Dorofeeva T.E.², Gitelman A.K.², Kulikova L.N.³, Lvov D.K.², Alkhovsky S.V.²

Results of investigation of ticks in Volga river delta (Astrakhan region, 2017) for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV) and other tick-borne arboviruses

¹Astrakhan Anti-plague Station, Astrakhan, 414024, Russia;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

³Center of Hygiene and Epidemiology in Astrakhan region, Astrakhan, 414057, Russia;

⁴Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414011, Russia;

⁵A.M. Nichogi Regional Infectious Clinical Hospital, Astrakhan, 414011, Russia

Introduction. There are natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) that vectored by *Hyalomma marginatum* ticks in Volga river delta (Astrakhan region, South of Russia). The circulation of Dhor virus (DHOV) (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*) has been also shown here. We hypothesized that other tick-borne arboviruses are also likely to circulate in the region. In particular, Bhanja virus (*Phlebovirus: Phenuiviridae*), Wad Medani virus (*Orbivirus: Reoviridae*), and Tamdy virus (*Orthonairovirus: Nairoviridae*), which were found to circulate in neighboring regions and are vectored by *Haemaphysalis* spp., *Dermacentor* spp., and *Hyalomma* spp. ticks.

Goals and objectives. The aim of the study was to examine ixodid ticks in Volga river delta for the presence of CCHFV, DHOV, Bhanja virus, Wad Medani virus, and Tamdy virus.

Material and methods. Ticks were collected in Volga river delta in 2017. We used molecular genetic methods for the detection and analysis of nucleic acids (PCR, sequencing, phylogenetic analysis).

Results. We detect CCHFV and DHOV RNA in *H. marginatum* ticks. The rate of infected *H. marginatum* ticks was 1.98% for CCHFV and 0.4% for DHOV. The results of genetic analysis showed that found DHOV strains are almost identical (99-100% in the M gene) and forms a separate genetic lineage alongside of Batken virus from Central Asia. At the same time, Bhanja virus, Wad Medani virus, and Tamdy virus were not found in ticks, collected in this region.

Conclusions. DHOV is circulating in the natural foci of CCHF in the Volga river delta. The ratio of infection of *H. marginatum* with CCHFV and DHOV was determined for the first time.

Keywords: tick-borne arboviruses; Crimean-Congo hemorrhagic fever virus; Dhor virus; *Hyalomma marginatum*; *Dermacentor marginatus*.

For citation: Vakalova E.V., Butenko A.M., Vishnevskaya T.V., Dorofeeva T.E., Gitelman A.K., Kulikova L.N., Lvov D.K., Alkhovsky S.V. Results of investigation of ticks in Volga river delta (Astrakhan region, 2017) for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (*Nairoviridae*, *Orthonairovirus*, CCHFV) and other tick-borne arboviruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(5): 221-228. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-221-228>

For correspondence: Sergey V. Alkhovsky, Doctor of Biological Sciences, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>. E-mail: salkh@ya.ru; s_alkhovsky@gamaleya.org

Information about authors:

Vakalova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6121-5900>

Butenko A.M., <https://orcid.org/0000-0001-6152-5685>

Vishnevskaya T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6963-8681>

Dorofeeva T.E., <https://orcid.org/0000-0001-8846-0092>

Gitelman A.K., <https://orcid.org/0000-0002-8410-2332>

Kulikova L.N., <https://orcid.org/0000-0003-3066-3430>

Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Alkhovsky S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>

Acknowledgments. The work was carried out with the financial support of RFBR, project №18-04-01302a.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21 November 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

В дельте Волги (Астраханская область) расположены активные природные очаги Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). Основным переносчиком ККГЛ являются клещи *Hyalomma marginatum*. Всего на территории Астраханской области встречается более 20 видов иксодовых (*Ixodidae*) клещей, включая *H. marginatum*, *H. scupense*, *H. asiaticum*, *H. anatolicum*, *H. dromedarii*, *H. detritum*, *H. aegyptium*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus*, *Boophilus annulatus*, *B. calcaratus*, *Rhipice-*

phalus pumilio, *Rh. schulzei*, *Rh. sanguineus*, *Rh. rossicus*, *Rh. turanicus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haem. impessum*, *Ixodes ricinus*, и *Ix. crenulatus* [1, 2]. В сборах с крупного рогатого скота доминируют *H. marginatum* (51,3%), *H. scupense* (43,6%) и *D. niveus* (2,2%), тогда как клещи, снятые с людей, представлены в основном *Rh. pumilio* (57,9%), *H. marginatum* (19,9%), *D. niveus* (6,9%), *Rh. sanguineus* (8,7%), *Rh. turanicus* (2,3%) и *Rh. rossicus* (1,8%). Остальные виды клещей составляют в сборах от 0,01 до 0,9% [3]. Многие из этих видов известны как переносчики клещевых арбовирусных инфекций человека и животных в других странах, однако связанные с ними

арбовирусы остаются недостаточно изученными в данном регионе. Из клещевых арбовирусов в дельте Волги ранее была показана циркуляция как минимум трёх вирусов: Дхори, Бханджа и Укуниими. При этом изоляция штаммов была получена только для вируса Дхори (Dhori virus, DHOV) (*Thogotovirus: Orthomyxoviridae*), который, так же как и ККГЛ, экологически связан с *H. marginatum* [4–6]. Вирус Дхори широко распространён в дельте Волги и способен вызывать у людей лихорадочное заболевание с явлениями менингоэнцефалита [7]. Циркуляция остальных упомянутых клещевых арбовирусов была определена только на основе серологических исследований сыроворотков крови людей и сельскохозяйственных животных.

Вирус Бханджа (Bhanja virus, BHAV) (*Phlebovirus: Phenuiviridae*) был впервые изолирован в Индии от клещей *Haem. intermedia* [8]. Позднее несколько штаммов вируса Бханджа были изолированы от *Haem. punctata* и *Haem. sulcata* в Восточной Европе и Италии [9–13]. Серологически (выявление антител у животных и людей) циркуляция вирусов Бханджа выявлена во многих странах Средиземноморья, Ближнего Востока, Азии, Африки [14]. Несколько штаммов вируса Бханджа изолированы от *Rh. bursa* и *D. marginatus* в Закавказье [15]. Инфекция вируса Бханджа является патогенной для молодняка мелкого рогатого скота, вызывая поражение центральной нервной системы [16]. У людей инфекция вируса Бханджа в основном протекает бессимптомно, однако описаны несколько случаев лихорадочного заболевания и менингоэнцефалита [17, 18]. Два серологически верифицированных случая лихорадки Бханджа были выявлены в Астраханской области в 2002 и 2003 гг. соответственно [19].

Исходя из видового состава распространённых здесь клещей, мы предположили, что в данном регионе возможна циркуляция и других клещевых арбовирусов. В частности тех, которые циркулируют в соседних регионах и переносятся клещами *Hyalomma* spp.: вирусы Вад Медани (Wad Medani virus, WMV) (*Orbivirus: Reoviridae*) и Тамды (Tamdy virus, TAMV) (*Orthonairovirus: Nairoviridae*).

Вирус Вад Медани распространён в Индии, Африке и Средней Азии. Несколько штаммов вируса Вад Медани были изолированы от клещей *H. asiaticum* в Туркмении, Казахстане и Армении и от клещей *H. anatolicum* в Таджикистане [20]. Значение вируса Вад Медани в инфекционной патологии человека и животных неизвестно.

Вирус Тамды был впервые изолирован из клещей *H. asiaticum* в Узбекистане [21]. Позднее было показано, что он широко распространён на территории Средней Азии (Узбекистан, Туркмения, Киргизия, Казахстан) и в Закавказье (Армения и Азербайджан). В основном вирус изолировали от *H. asiaticum*, *H. marginatum*, *Rh. turanicus* и *Haem. concinna*, а также от птиц и лихорадящих людей. В 2018 г. вирус Тамды был обнаружен в клещах *H. marginatum* в Турции [22]. Заражение человека вирусом Тамды приводит к развитию лихорадочного заболевания [23]. Лихорадочное заболевание, вызванное вирусом Тамды было

зарегистрировано в Синьцзян-Уйгурском автономном округе Китая в 2018 г. [24].

Целью настоящей работы было определение заражённости иксодовых клещей, распространённых в дельте Волги, клещевыми арбовирусами, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды.

Материал и методы

Клещей собирали со скота и на флаг на территории Астраханской (11 районов) и Волгоградской (один район) областей, а также Республики Калмыкия (3 района) в апреле–июле 2017 г. Всего было собрано 3736 клещей: 3418 в Астраханской области, 37 в Волгоградской, 281 в Республике Калмыкия. Образцы были пулированы в 341 пробу (302, 7 и 32 соответственно). Видовой состав был представлен пятью видами клещей: *H. marginatum* (3071; 82,2%), *D. marginatus* (567; 15,2%), *H. scupense* (80; 2,1%), *Rh. schulzei* (8; 0,2%), *Rh. rossicus* (10; 0,3%). Видовой состав клещей из Астраханской области представлен в табл. 1. Пулы клещей или отдельные экземпляры напившихся клещей растирали в фарфоровой ступке и гомогенизировали в 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия. Далее суспензии осветляли 1 мин при 10 000 об/мин.

Для детекции вируса ККГЛ из полученной осветлённой суспензии выделяли РНК с использованием набора «Рибо-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и проводили ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов «Ампли Сенс® CCHFV-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и амплификатора «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) в соответствии с инструкцией производителя тест-систем.

Для выявления других клещевых арбовирусов РНК из суспензий выделяли по методу Хомчинского [25]. В качестве внутреннего контроля в каждую пробу был добавлен препарат РНК-содержащего фага MS2 в количестве, соответствующем приблизительно 10^3 РНК-копий на пробу. Праймеры для ПЦР для детекции вирусов Бханджа, Дхори, Вад Медани, Тамды были подобраны с использованием программы AlleleID 7.80 (PREMIER Biosoft, США). При использовании двухраундовой ПЦР (для вирусов Бханджа и Дхори) обратную транскрипцию проводили с использованием специфических обратного и прямого праймера и обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Scientific, США). Далее проводили два раунда ПЦР с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Положительные пробы использовали для получения более длинных ПЦР-фрагментов с использованием праймеров, представленных в табл. 2. Для детекции вирусов Тамды и Вад Медани были подобраны праймеры и флуоресцентные зонды для применения в одностадийной ОТ-ПЦР-РВ. Для ОТ-ПЦР-РВ использовали реагент TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (ThermoFisher Scientific, США). В качестве положительного контроля использовали штаммы вирусов, полученные из Государственной коллекции вирусов при Институте вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Таблица 1
Видовой состав клещей, собранных в Астраханской области, и результаты их тестирования в ОТ-ПЦР на клещевые арбовирусы.

Территория	<i>Hyalomma marginatum</i> , абс. (%)	<i>Dermacentor marginatus</i> , абс. (%)	<i>Hyalomma scupense</i> , абс. (%)	<i>Rhipicephalus schulzei</i> , абс. (%)	<i>Rhipicephalus rossicus</i> , абс. (%)	Итого	ККГЛ*, абс. (%)	ДНОУ*, абс. (%)	ВНАУ, абс. (%)	ТАМУ, абс. (%)	ВМУ, абс. (%)
Ахтубинский район	21 (100)	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0
Володарский район	126 (89)	1 (1)	14 (10)	0	0	141	0	3 (2,4)	0	0	0
Енотаевский район	1006 (100)	0	0	0	0	1006	3 (0,3)	1 (0,1)	0	0	0
Икрянинский район	73 (57,4)	48 (37,8)	0	0	6 (4,8)	127	2 (2,7)	1 (0,8)	0	0	0
Камызякский район	123 (91)	5 (4)	0	7 (5)	0	135	5 (4)	4 (3,3)	0	0	0
Красноярский район	446 (90,7)	0	45 (9,1)	1 (0,2)	0	492	28 (6,3)	4 (0,9)	0	0	0
Лиманский район	91 (22,8)	309 (77,2)	0	0	0	400	1 (1)	0	0	0	0
Наримановский район	270 (100)	0	0	0	0	270	4 (1,48)	1 (0,4)	0	0	0
Приволжский район	235 (100)	0	0	0	0	235	10 (4,3)	0	0	0	0
Харабалинский район	558 (100)	0	0	0	0	558	6 (1,1)	0	0	0	0
Черноярский район	22 (67)	0	11 (33)	0	0	33	0	0	0	0	0
Всего...	2971 (87)	363 (10,6)	70 (2)	8 (0,23)	6 (0,17)	3418	59 (1,98)	14 (0,47)	0	0	0

Примечание. * Для вирусов ККГЛ и Дхори представлены число положительных проб и вирусософормность (%) клещей *H. marginatum* без учёта остальных видов клещей.

Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Life Technologies, США) и специфических праймеров (см. табл. 2). Результаты реакции анализировали путём электрофоретического разделения на приборе «Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers» (Life Technologies, США). Анализировали полученные данные в программе SeqMan (DNASTar, США). Выравнивание последовательностей по алгоритму ClustalW и дальнейший филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>).

Результаты

На первом этапе были подобраны праймеры для детекции в ОТ-ПЦР вирусов Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды. Для каждого вируса геномные последовательности разных штаммов были выровнены между собой и на основе полученных выравниваний выбраны наиболее консервативные участки генома. Для вируса Дхори использовали последовательности двух известных вирусов: Дхори и Баткен [26]. В результате мишенью для праймеров был выбран ген, кодирующий матриксный белок М. Для вируса Бханджа использовали последовательности штаммов вируса Бханджа, а также вирусов Раздан (Razdan virus, RAZV) и Палма (Palma virus, PLMV), изолированных в Армении и Португалии соответственно. Мишенью для праймеров был выбран ген нуклеокапсида N (сегмент S). Для вируса Вад Медани использовали геномные последовательности штаммов, изолированных в Средней Азии и Закавказье [20]. Мишенью для праймеров был выбран ген белка внутреннего кора T2 (сегмент 2). Для вируса Тамды использовали последовательности трёх штаммов из Средней Азии и Закавказья [27]. Мишенью для праймеров был выбран ген нуклеокапсида N (сегмент S). В результате для вирусов Вад Медани и Тамды были подобраны праймеры и зонды для их детекции в режиме ОТ-ПЦР-РВ. Для вирусов Дхори и Бханджа были подобраны праймеры для применения в стандартной двухраундовой ПЦР и последующей детекции ПЦР-фрагмента в агарозном геле. Подобранные праймеры представлены в табл. 2. Специфичность праймеров была протестирована на панели музейных штаммов различных клещевых арбовирусов (данные не представлены).

При исследовании материала на вирус ККГЛ выявлено 59 положительных проб, что составило 17,3% проанализированных пулированных образцов. Все положительные пробы были найдены в Астраханской области. Из них 58 принадлежали *H. marginatum* и один положительный образец был представлен пулом клещей *H. scupense*, собранных в Красноярском районе. Для расчёта вирусософормности принимали, что в положительном пуле заражён только один клещ. Рассчитанная таким образом вирусософормность клещей *H. marginatum* составила 1,98%. При этом вирусософормность *H. marginatum* в разных районах Астраханской области варьировала от 0 до 6,3% (Красноярский район) (см. табл. 1).

При исследовании материала на вирус Дхори выявлено 14 положительных проб, что составило 4,1% проанализированных пулированных образцов. Все положительные по вирусу Дхори образцы принадлежали *H. marginatum*, собранным в Астраханской области. Общая вирусофорность *H. marginatum* составила 0,47%. При этом, так же как и для вируса ККГЛ, заражённость клещей вирусом Дхори варьировала в разных районах (см. табл. 1). Наибольшее число положительных проб (по четыре) найдены в Камызякском и Красноярском районах, где вирусофорность клещей *H. marginatum* составила 3,3 и 0,9% соответственно. Три (2,4%) положительных пробы найдены в Володарском районе (см. табл. 1).

В шести образцах *H. marginatum* были одновременно обнаружены и вирус ККГЛ и вирус Дхори, что составило 1,75% проанализированных проб и 0,2% общего числа обследованных клещей *H. marginatum*.

С целью анализа генетических характеристик выявленных штаммов вируса Дхори для 12 из 14 положительных проб были амплифицированы два перекрывающихся ПЦР-фрагмента. Фрагменты были получены на матрице продукта I раунда с использованием сочетания праймеров 68F/524R и 234F/697R. Полученные фрагменты были секвенированы. В результате определена частичная последовательность (около 600 из 950 н.о.) гена М выявленных штаммов. Последовательности были депонированы в GenBank под номерами MN720206–MN720217. Результаты сравнительного генетического анализа показали, что выявленные штаммы вируса Дхори практически идентичны между собой (99–100% н.о.) по анализируемому гену. С другими вирусами, принадлежащими виду *Dhori thogotovirus*, геномные последовательности которых опубликованы в базе данных GenBank, выявленные штаммы имеют от 87,2 до 98,6% идентичности по данному участку генома. При этом наибольший уровень схожести (97,9–98,6%) выявленные штаммы ви-

руса Дхори имеют с вирусом Баткен (BATKV), выделенным от клещей *H. marginatum* в Киргизии в 1970 г. [26, 28]. На дендрограмме, построенной на основе полученных последовательностей, астраханские штаммы формируют отдельный кластер рядом с вирусом Баткен (см. рисунок).

Для вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды положительных ПЦР-образцов в исследуемом материале не найдено.

Обсуждение

Целью настоящей работы было исследование заражённости клещей в дельте Волги клещевыми арбовирусами, включая вирус ККГЛ и малоизученные вирусы Дхори, Бханджа, Вад Медани и Тамды. Согласно полученным данным, общая заражённость вирусом ККГЛ клещей *H. marginatum* в 2017 г. составила 1,98%, что сопоставимо с данными, полученными за 2016 г., – 1,5% [3]. Генетическая структура вирусной популяции вируса ККГЛ, циркулирующей в данном регионе, была изучена ранее [3, 29], поэтому мы не проводили дополнительный генетический анализ выявленных штаммов.

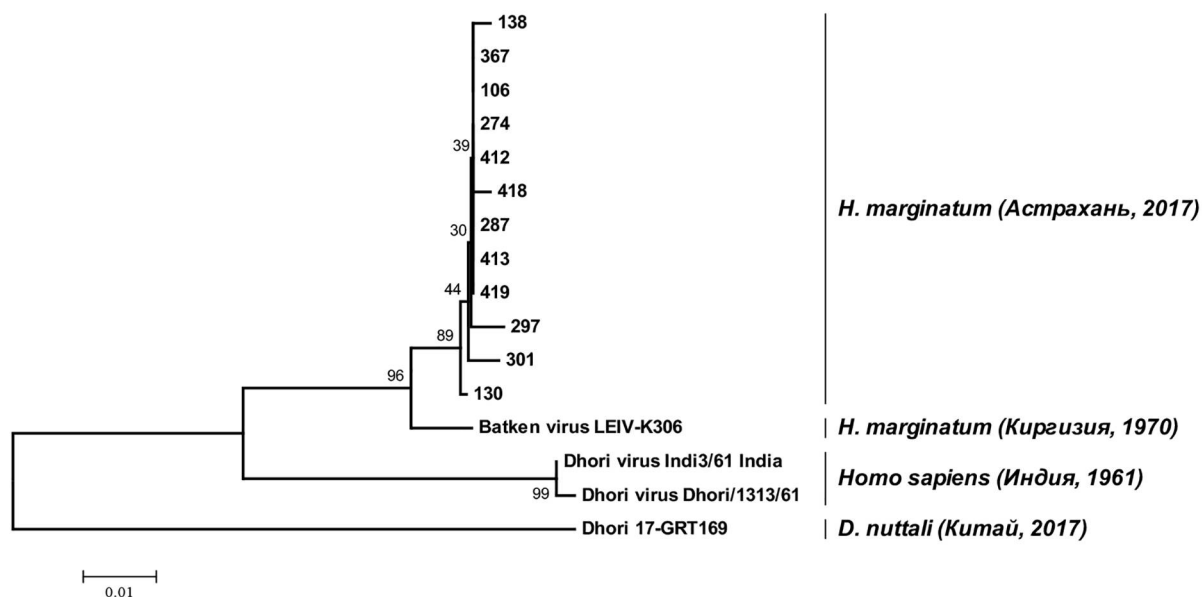
Циркуляция вируса Дхори в дельте Волги известна с 1971 г., когда несколько штаммов вируса были изолированы от клещей *H. marginatum* и комаров *Anopheles hyrcanus* [6]. Позднее вирус Дхори многократно выделяли здесь как от клещей *H. marginatum*, так и от их позвоночных прокормителей [4, 5]. Согласно полученным нами данным, заражённость клещей *H. marginatum* вирусом Дхори в 2017 г. составила 0,4%, что практически в 5 раз меньше, чем вирусом ККГЛ (1,98%). В других видах клещей, собранных здесь, вирус Дхори не найден. Мы обнаружили несколько образцов *H. marginatum*, одновременно положительных по вирусу ККГЛ и Дхори. Поскольку образцы представляли собой пулы клещей, мы не можем однозначно заключить, являются ли положительные находки микст-инфекцией ККГЛ/Дхори, или

Таблица 2

Праймеры и зонды, использованные в работе

Вирус; мишень	Название; последовательность	Назначение
Бханджа (Bhanja virus, BHAV, S сегмент)	BHAV162F; TTGATAAGGATGGCTGGAAAGATGA	ОТ* и I раунд ПЦР
	BHAV594R; TTGCCYCTCACYTTTGGGTTRAT	
	BHAV234F; CCAARGCCATGGCYAARATGTC	II раунд ПЦР
	BHAV573R; ATCAGYTGGGTGAARTARAAYTGCCA	
Дхори (Dhori virus, DHOV, М ген)	Batk68F; CCTGCGCTCGAATCTGGAAAAC	ОТ и I раунд ПЦР
	Batk697R; CTTGGTGRCCCTGCAGGATTGAGC	
	Batk234F; GAAGGGGTACAAAGCAAAGGATGG	II раунд ПЦР
	Batk524R; TTTAGGACGGGTGTGAGGGTGTG	
Вад Медани (Wad Medani, WMV, T2 ген)	WM1452pr; YTCAGGAGATGACTTCCGCT	
	F: WM1408F; TTTTATCTTGGATACGATCC	
	WM1408Fa; TTTTATCTCGGATATGATCC	
Тамды (Tamdy virus, TAMV, S сегмент)	TAMV1930pr; CGGCTCAAGGTATGTGCTCC	Зонд для ПЦР-PB
	TAMV422F; AGGCTAATAATGCAGTCAT	ОТ-ПЦР-PB
	TAMV557R; CTCTTCTTGTGGTCTCA	ОТ-ПЦР-PB

Примечание. *ОТ – обратная транскрипция.



Дендрограмма, построенная с использованием алгоритма ближайшего соседа (Neighbor-Joining method) на основе сравнения гена М вирусов вида *Dhori thogotovirus* (Thogotovirus: Orthomyxoviridae) и выявленных положительных ОТ-ПЦР-проб (обозначены номерами). Справа указаны источник, место и год выделения (выявления) анализируемых вирусов. Эволюционная дистанция рассчитана с использованием параметрической модели Кимуры (Kimura 2-parameter method). Филогенетический анализ и визуализация дендрограммы проведены с использованием программы MEGA7.

это разные клещи в пуле, инфицированные каждый отдельным вирусом. Ранее было показано, что при вирусологическом обследовании *H. marginatum* часто выделяются микст-изоляты ККГЛ/Дхори, что свидетельствует о возможности инфицирования клеща двумя вирусами одновременно [4, 5]. Вирусы ККГЛ и Дхори занимают общую экологическую нишу (клещ *H. marginatum*) и, вероятно, интерферируют. Интерференция может происходить как на уровне отдельной особи клеща, так и на популяционном уровне при взаимодействии переносчиков и их позвоночных хозяев. Таким образом, высказывается гипотеза, что заражённость клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в 2017 г. представляют основу для дальнейшего изучения их возможного взаимодействия в динамике. Согласно результатам проведённого генетического анализа, циркулирующая в дельте Волги популяция вируса Дхори, достаточно гомогенна и формирует отдельный генетический кластер, для которого вирус Баткен (антигенный вариант вируса Дхори) из Средней Азии является ближайшей внешней группой.

Ранее было показано, что в дельте Волги циркулирует вирус Бханджа. Хотя случаев выделения вируса в данном регионе не описано, при исследовании сывороток крови людей и животных были обнаружены специфические антитела к вирусу Бханджа. Два случая лихорадочного заболевания были выявлены здесь

в 2002 и 2003 гг. соответственно [19]. Кроме этого, среди распространённых в дельте Волги иксодовых клещей присутствуют виды, известные как его переносчики. Большинство известных штаммов вируса Бханджа были изолированы в Индии и Европе от клещей *Haemaphysalis* spp. Вместе с тем несколько штаммов вируса (включая его антигенный вариант, вирус Раздан (RAZV)) были изолированы от клещей *Rh. bursa* и *D. marginatus* в Армении и Азербайджане [15]. Вместе с клещами *H. marginatum* (2971 экземпляр) мы протестировали 363 экземпляра *D. marginatus*, собранных в различных районах Астраханской области, но положительных проб не обнаружили. Исходя из этого можно заключить, что *H. marginatum* и *D. marginatus* не являются носителями вируса Бханджа в дельте Волги или их заражённость очень низкая. Вероятно, отсутствие в сборе основного переносчика вируса Бханджа в Европе, клещей *Haemaphysalis* spp., а также незначительное количество протестированных клещей *Rhipicephalus* spp. (14 экземпляров) не дало нам возможности подтвердить молекулярно-генетическими методами циркуляцию вируса Бханджа на обследованной территории.

Два других вируса, которые были исследованы в настоящей работе (Вад Медани и Тамды), широко распространены в Средней Азии и Закавказье и экологически связаны с *Hyalomma* spp. Вирус Вад Медани изолировали от *H. asiaticum* и *H. anatolicum*, а также от других видов клещей. Вирус Тамды и его антигенные варианты многократно изолировали от *Hyalomma* spp., преимущественно *H. asiaticum*, а также от других видов клещей, птиц и людей. Несколько штаммов бы-

ли изолированы от *H. marginatum*, собранных в Средней Азии и Турции. Таким образом, мы предполагали, что ареал вирусов Вад Медани и Тамды совпадает с ареалом его основного переносчика, *Hyalomma* spp., и захватывает дельту Волги. Однако положительных образцов нами не обнаружено.

Заключение

В настоящей работе показано, что заражённость клещей *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори в дельте Волги составила в 2017 г. 1,98 и 0,4% соответственно. Таким образом, вирус Дхори активно циркулирует в природных очагах ККГЛ на обследованной территории. Нами впервые получены количественные показатели соотношения заражённости *H. marginatum* вирусами ККГЛ и Дхори. В то же время исследованные клещи *H. marginatum* и *D. marginatus*, распространённые в дельте Волги, не являются носителями вирусов Бханджа, Вад Медани и Тамды.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-04-01302а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8-18, 21, 22, 24, 25, 28, 29 см. REFERENCES)

1. Зими́на Ю.В., Куликова Л.Н., Салько В.Н., Ковтунов А.И. Иксодовые клещи в Астраханской области, их роль в формировании природных очагов и передаче арбовирусов человеку. В кн.: *Вопросы риккетсиологии и вирусологии (Сборник научных трудов)*. Астрахань-Москва; 1996: 58-62.
2. Зими́на Ю.В., Бируля Н.Б., Березин В.В. Материалы зоолого-паразитологической характеристики Крымской геморрагической лихорадки в Астраханской области. В кн.: *Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. Том 7*. М.; 1965: 288-395.
3. Вакалова Е.В., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Куликова Л.Н., Викторова Н.В. Детекция и генетическая характеристика РНК-изолятов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных из клещей *Hyalomma marginatum* в Астраханской области (2016 г.). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(5): 248-53. Doi: <https://doi.org/10.1882/1560-9529-2017-22-5-248-253>
4. Смирнова С.Е., Карань Л.С., Колесникова Н.М., Рыбкин В.С., Платонов А.Е. Распространение вируса Баткен/Дхори в эндемичной по Крымской-Конго геморрагической лихорадке Астраханской области РФ. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2011; (1): 12.
5. Львов Д.Н., Джаркенов А.Ф., Аристова В.А., Ковтунов А.И., Громашевский В.Л., Вышемирский О.И. и др. Изоляция вирусов Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Bunyaviridae, Nairovirus) от зайца (*Lepus europaeus*) и собранных с него клещей *Hyalomma marginatum* в средней зоне дельты Волги, Астраханская область, 2001 г. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(4): 32-6.
6. Бутенко А.М., Чумаков В.М. Выделение нового для СССР арбовируса «Астра» из клещей *H. plumbeum* и комаров *An. hyrcanus* в Астраханской области. В кн.: *Вопросы медицинской вирусологии. Часть 2*. М.; 1971: 11-112.
7. Бутенко А.М., Лещинская Е.В., Семашко И.В., Донец М.А., Мартыанова Л.И. Вирус Дхори — возбудитель заболевания человека, пять случаев лабораторной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 1987; 32(6): 724-9.
19. Азарян А.Р., Гришанова А.П., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Чалов В.В., Инкина Т.Е. и др. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области. В кн.: Бутенко А.М., Баринский И.Ф., Карганова Г.Г., Малеев В.В., Терехин С.А., ред. *Арбовирусы и арбовирусные инфекции. Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и*

научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». М.: Гриф и К; 2007: 115-9.

20. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Гительман А.К. и др. Генетическая характеристика вируса Вад Медани (WMV - Wad Medani virus) (Reoviridae, Orbivirus), изолированного в Туркмении, Казахстане и Армении из иксодовых клещей *Hyalomma asiaticum* Schulze et Schlottke, 1930 и в Таджикистане из *H. anatolicum* Koch, 1844 (Ixodidae: Hyalomminae). *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(4): 25-30.
23. Львов Д.К. Лихорадка Тамды. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 783-5.
26. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Львов Д.Н. и др. Генетическая характеристика вируса Баткен (BKNV-Batken virus) (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), изолированного из иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 и комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 в Средней Азии. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 33-7.
27. Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Аристова В.А., Гительман А.К. и др. Таксономия ранее негруппированного вируса Тамды (TAMV – Tamdy virus) (Bunyaviridae, Nairovirus), изолированного от иксодовых клещей *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schülce et Schlottke, 1929 (Ixodidae, Hyalomminae) в Средней Азии и Закавказье. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 15-22.

REFERENCES

1. Zimina Yu.V., Kulikova L.N., Sal'ko V.N., Kovtunov A.I. Ixodid ticks in Astrakhan region, and their role in the forming of natural foci and transmission of arboviruses to human. In: *Issues of Rickettsiology and Virology (Collection of Scientific Papers) [Voprosy rikketsiologii i virusologii (Sbornik nauchnykh trudov)]*. Astrakhan'-Moscow; 1996: 58-62. (in Russian)
2. Zimina Yu.V., Birulya N.B., Berezin V.V. Materials of zoological and parasitological characteristics of the Crimean hemorrhagic fever in the Astrakhan region. In: *Proceedings of Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of AMS USSR. Volume 7 [Trudy Instituta poliomyelita i virusnykh entsefalitov. Tom 7]*. Moscow; 1965: 288-395. (in Russian)
3. Vakalova E.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Kulikova L.N., Viktorova N.V. Detection and genetic characterization of RNA isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from the *Hyalomma marginatum* ticks collected in the Astrakhan region (2016). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(5): 248-53. Doi: <https://doi.org/10.1882/1560-9529-2017-22-5-248-253> (in Russian)
4. Smirnova S.E., Karan' L.S., Kolesnikova N.M., Rybkin V.S., Platonov A.E. Prevalence of Batken/Dhori virus in the Crimean-Congo hemorrhagic fever-endemic Astrakhan Region of the Russian Federation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2011; (1): 12. (in Russian)
5. L'vov D.N., Dzharkenov A.F., Aristova V.A., Kovtunov A.I., Gromashevskiy V.L., Vyshemirskiy O.I. The isolation of Dhori viruses (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Bunyaviridae, Nairovirus) from the hare (*Lepus europaeus*) and its ticks *Hyalomma marginatum* in the middle zone of the Volga delta, Astrakhan region, 2001. *Voprosy virusologii*. 2002; 47(4): 32-6. (in Russian)
6. Butenko A.M., Chumakov V.M. Isolation of a new for USSR arbovirus "Astra" from ticks *H. plumbeum* and mosquitoes *An. hyrcanus* in Astrakhan district. In: *Issues of Medical Virology. Part 2 [Voprosy meditsinskoy virusologii. Chast' 2]*. Moscow; 1971: 11-112. (in Russian)
7. Butenko A.M., Leshchinskaya E.V., Semashko I.V., Donets M.A., Mart'yanova L.I. Dhori virus – a causative agent of human disease, 5 cases of laboratory infection. *Voprosy virusologii*. 1987; 32(6): 724-9. (in Russian)
8. Shah K.V., Work T.H. Bhanja virus: a new arbovirus from ticks *Haemaphysalis intermedia* Warburton and Nuttall, 1909, in Orissa, India. *Indian J. Med. Res.* 1969; 57(5): 793-8.
9. Verani P., Balducci M., Lopes M.C., Sacca G. Isolation of Bhanja virus from *Haemaphysalis* ticks in Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1970; 19(1): 103-5. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.103>

10. Vesenjak-Hirjan J., Calisher C.H., Brudnjak Z., Tovornik D., Skrtic N., Lazuick J.S. Isolation of Bhanja virus from ticks in Yugoslavia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26(5 Pt. 1): 1003-8. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.1003>
11. Ungureanu A., Popovici V., Cătănaș F., Ioniță I., Tutoveanu A., Safta M. Isolation of Bhanja virus in Romania. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* 1990; 49(2): 139-45.
12. Pavlov P., Rosický B., Hubálek Z., Daniel M., Bárdos V., Minár J., et al. Isolation of Bhanja virus from ticks of the genus *Haemaphysalis* in southeast Bulgaria and presence of antibodies in pastured sheep. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1978; 25(1): 67-73.
13. Filipe A.R., Alves M.J., Karabatsos N., de Matos A.P., Nuncio M.S., Bacellar F. Palma virus, a new bunyaviridae isolated from ticks in Portugal. *Intervirology*. 1994; 37(6): 348-51. Doi: <https://doi.org/10.1159/000150399>
14. Hubálek P. Geographic distribution of Bhanja virus. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1987; 34(1): 77-86.
15. Lvov D.K., Gromashevsky V.L., Zakaryan V.A., Skvortsova T.M., Berezina L.K., Gofman Y.P., et al. Razdan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in Armenia. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 506-8.
16. Mádr V., Hubálek Z., Zendulková D. Experimental infection of sheep with Bhanja virus. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1984; 31(1): 79-84.
17. Calisher C.H., Goodpasture H.C. Human infection with Bhanja virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975; 24(6 Pt. 1): 1040-2. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.1040>
18. Punda V., Ropac D., Vesenjak-Hirjan J. Incidence of hemagglutination-inhibiting antibodies for Bhanja virus in humans along the north-west border of Yugoslavia. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A*. 1987; 265(1-2): 227-34. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(87\)80170-0](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(87)80170-0)
19. Azaryan A.R., Grishanova A.P., Butenko A.M., Larichev V.F., Chalov V.V., Inkina T.E., et al. Serological diagnostics of arboviral infections in Astrakhan region. In: Butenko A.M., Barinskiy I.F., Karganova G.G., Maleev V.V., Terekhin S.A., eds. *Arboviruses and arbovirus infections. Materials of the enlarged plenum of the «Arboviruses» Problem Commission and the scientific-practical conference «Arboviruses and Arbovirus Infections» [Arbovirusy i arbovirusnye infektsii. Materialy rasshirennogo plenuma problemnoy komissii «Arbovirusy» i nauchno-prakticheskoy konferentsii «Arbovirusy i arbovirusnye infektsii»]*. Moscow: Grif i K; 2007: 115-9. (in Russian)
20. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Gitel'man A.K., et al. Genetic characterization of the Wad Medani virus (WMV) (Reoviridae, Orbivirus), isolated from the ticks *Hyalomma asiaticum* Schulze et Schlottke, 1930 (Ixodidae: Hyalomminae) in Turkmenistan, Kazakhstan, and Armenia and from the ticks *H. anatolicum* Koch, 1844 in Tajikistan. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(4): 25-30. (in Russian)
21. Lvov D.K., Sidorova G.A., Gromashevsky V.L., Kurbanov M., Skvortsova L.M., Gofman Y.P., et al. Virus "Tamdy" – a new arbovirus, isolated in the Uzbee S.S.R. and Turkmen S.S.R. from ticks *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schuller et Schlottke, 1929, and *Hyalomma plumbeum plumbeum* Panzer, 1796. *Arch. Virol.* 1976; 51(1-2): 15-21. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01317830>
22. Brinkmann A., Dincer E., Polat C., Hekimoglu O., Hacıoglu S., Foldes K., et al. A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5): 1173-83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.017>
23. L'vov D.K. Tamdy fever. In: L'vov D.K., ed. *Handbook of Virology. Viruses and Viral Infection of Human and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 783-5. (in Russian)
24. Liu X., Zhang X., Wang Z., Dong Z., Xie S., Jiang M., et al. A Tentative Tamdy Orthonairovirus Related to Febrile Illness in North-western China. *Clin. Infect. Dis.* 2019; pii: ciz602. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz602>
25. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9. Doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
26. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., L'vov D.N., et al. Genetic characterization of the Batken virus (BKNV) (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) isolated from the Ixodidae ticks *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 and the mosquitoes *Aedes caspius* Pallas, 1771, as well as the *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 in the Central Asia. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 33-7. (in Russian)
27. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Aristova V.A., Gitel'man A.K., et al. Taxonomy of previously unclassified Tamdy virus (TAMV) (Bunyaviridae, Nairovirus) isolated from the *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schulze et Schlottke, 1929 (Ixodidae, Hyalomminae) in the Middle East and transcaucasia. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 15-22. (in Russian)
28. Lvov D.K., Karas F.R., Tsyarkin Y.M., Vargina S.G., Timofeev E.M., Osipova N.Z., et al. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitoes in Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1974; 44(1): 70-3. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01242183>
29. Lukashev A.N., Deviatkin A.A. Phylogenetics of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in South Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 59: 23-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.016>

Поступила 21.11.19

Принята в печать 28.11.19