

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики

Карташов М.Ю.¹, Гладышева А.В.¹, Найденова Е.В.², Захаров К.С.², Швалов А.Н.¹, Кривошеина Е.И.¹, Сеничкина А.М.², Ба М.Б.³, Терновой В.А.¹, Бумбали С.³, Локтев В.Б.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, п.г.т. Кольцово, Россия;

²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, г. Саратов, Россия;

³Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Гвинейская Республика

Введение. Иксодовые клещи – переносчики возбудителей многих инфекционных болезней. Недавно при исследовании клещей *Rhipicephalus geigy*, собранных с домашнего скота в Гвинейской Республике, обнаружен новый многокомпонентный флавиподобный РНК-содержащий вирус, получивший название Kindia tick virus (KITV), с необычным механизмом реализации генетической информации.

Цель работы – обнаружение и исследование генетического разнообразия KITV в иксодовых клещах, собранных на территории провинции Киндиа Гвинейской Республики.

Материалы и методы. В 2021 г. с крупного рогатого скота собрано 324 экземпляра клещей видов *Amblyomma variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*, *Rh. senegalensis*. Детекция вирусной РНК проводилась в индивидуальных образцах клещей методом ОТ-ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности и проведением филогенетического анализа.

Результаты и обсуждение. Инфицированность KITV клещей вида *Rh. geigy* составила 12,2%, *Rh. annulatus* – 4,4%, *Rh. decoloratus* – 3,3%. Однако генетический материал KITV в клещах *Am. variegatum*, являющихся одним из доминирующих видов в Западной Африке, выявлен не был. Для всех изолятов вируса определена частичная нуклеотидная последовательность каждого из четырёх вирусных сегментов (GenBank, OK345271–OK345306), филогенетический анализ которых показал высокий уровень их тождественности (98,5–99,8%) по каждому из четырёх сегментов вирусного генома с ранее обнаруженными в Гвинейской Республике. Полученные изоляты KITV наиболее генетически близки к Mogiana tick virus, который ранее был обнаружен в Южной Америке в клещах *Rh. microplus*, и существенно отличаются от других многокомпонентных вирусов, циркулирующих в странах Европы и Азии, в том числе и в Российской Федерации.

Заключение. Генетический материал KITV обнаружен в трёх видах иксодовых клещей, собранных с домашнего скота ряда префектур Гвинейской Республики. Уровень инфицированности клещей составил 3,3–12,2%. Актуальным остаётся продолжение исследований в данном направлении.

Ключевые слова: многокомпонентные флавиподобные вирусы; Kindia tick virus; KITV; иксодовые клещи; Гвинейская Республика

Для цитирования: Карташов М.Ю., Гладышева А.В., Найденова Е.В., Захаров К.С., Швалов А.Н., Кривошеина Е.И., Сеничкина А.М., Ба М.Б., Терновой В.А., Бумбали С., Локтев В.Б. Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 487-495. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии и вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора, 630559, п.г.т. Кольцово, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Участие авторов: Карташов М.Ю. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка данных, написание текста статьи; Гладышева А.В. – сбор и обработка материала, написание текста статьи; Найденова Е.В. – сбор и обработка материала, написание и редактирование текста статьи; Захаров К.С. – проведение лабораторных исследований, подготовка иллюстраций; Швалов А.Н. – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных; Кривошеина Е.И. – проведение лабораторных исследований; Сеничкина А.М. – проведение лабораторных исследований; Ба М.Б. – сбор и доставка проб биологического материала; Терновой В.А. – руководство исследованиями; Бумбали С. – руководство сбором и доставкой материала; Локтев В.Б. – общее руководство.

Финансирование. Исследования проводились в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации от 14.11.2020 № 2985-р о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Поступила 29.09.2022

Принята в печать 21.11.2022

Опубликована 30.12.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodes ticks on the territory of the Republic of Guinea

Mikhail Yu. Kartashov¹, Anastasia V. Gladysheva¹, Ekaterina V. Naidenova², Kirill S. Zakharov², Alexander N. Shvalov¹, Ekaterina I. Krivosheina¹, Aislu M. Senichkina², Mamadou B. Bah³, Vladimir A. Ternovoi¹, Sanaba Boumbaly³, Valery B. Loktev¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

²Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia;

³Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Introduction. Ixodes ticks are vectors for pathogens of many infectious diseases. Recently, during the study of *Rhipicephalus geigy* ticks collected from livestock in the Republic of Guinea, a new multicomponent flavi-like RNA virus, called Kindia tick virus (KITV), was discovered with an unusual mechanism for the implementation of genetic information.

The aim of the work is to detect and study the genetic diversity of KITV in ixodes ticks collected in the territory of the Kindia province of the Republic of Guinea.

Material and methods. In 2021, 324 specimens of ticks of the species *Amblyomma variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*, *Rh. senegalensis* were collected from cattle. The detection of viral RNA was carried out in individual samples of ticks by RT-PCR, followed by the determination of the nucleotide sequence and phylogenetic analysis.

Results and discussion. KITV detection rates in ticks of the species *Rh. geigy* was 12.2%, *Rh. annulatus* – 4.4%, *Rh. decoloratus* – 3.3%. However, the KITV genetic material has not been identified in *Am. variegatum* ticks, which are one of the dominant species in West Africa. For all virus isolates, a partial nucleotide sequences of each of the four viral segments (GenBank, OK345271–OK345306) were determined. The phylogenetic analysis showed a high level of identity (98.5–99.8%) for each of the four segments of the viral genome with those previously found in the Republic of Guinea. The obtained KITV isolates are most genetically close to Mogiana tick virus, which was previously detected in South America in *Rh. microplus* ticks and significantly differed from other multicomponent viruses circulating in Europe and Asia, including the Russian Federation.

Conclusion. KITV genetic material was found in three species of ixodid ticks collected from livestock in a number of prefectures of the Republic of Guinea. The infection rate in ticks was 3.3–12.2%. The continuation of research in this direction remains relevant.

Keywords: multicomponent flavi-like viruses; Kindia tick virus; KITV; ixodid ticks; Republic of Guinea

For citation: Kartashov M.Yu., Gladysheva A.V., Naidenova E.V., Zakharov K.S., Krivosheina E.I., Shvalov A.N., Senichkina A.M., Bah M.B., Ternovoi V.A., Boumbaly S., Loktev V.B. Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodid ticks on the territory of the Republic of Guinea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 487–495. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

For correspondence: Mikhail Yu. Kartashov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, FSBI State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Information about the authors:

Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Gladysheva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Zakharov K.S., <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Shvalov A.N., <https://orcid.org/0000-0001-6890-1575>

Krivosheina E.I., <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Senichkina A.M., <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>

Bah M.B., <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>

Ternovoi V.A., <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Boumbaly S., <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Contribution: Kartashov M.Yu. – organization and planning of research, performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation; Gladysheva A.V. – performing the experiments, text preparation; Naidenova E.V. – material collection and processing, text preparation; Zakharov K.S. – performing the experiments; illustrations preparation; Shvalov A.N. – presentation of results and illustrations, statistical processing of data; Krivosheina E.I. – performing the experiments; Senichkina A.M. – performing the experiments; Bah M.B. – collection and delivery of samples of biological material; Ternovoi V.A. – research management; Boumbaly S. – organization and control of research; Loktev V.B. – general guidance.

Funding. The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation of November 14, 2020 No. 2985-p on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Received 29 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

Введение

События последних десятилетий позволяют по-другому оценить проблему новых и вновь возникающих инфекционных болезней вирусной этиологии. Яркими примерами чрезвычайных ситуаций, характеризующими всю опасность таких инфекций, могут служить эпидемии птичьего гриппа типа H_5N_1 и лихорадки Зика, а также продолжающаяся пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2. Возникновение этих инфекционных заболеваний является результатом вторичной или межвидовой передачи вирусных агентов от их естественных хозяев к человеку [1].

В то же время рядом авторов показано, что различные вирусы, представляющие разные семейства, выстраивают взаимоотношения в схеме «вирус – хозяин» по определённым правилам. Так, представители семейства *Flaviviridae* демонстрируют разнообразные примеры таких взаимодействий [2–4]. Например, вирусы денге, Зика или желтой лихорадки передаются комарами, вирус клещевого энцефалита – клещами, а вирус гепатита С вообще не имеет членистоногих переносчиков.

В связи с этим определённый интерес представляет обнаружение новых флавиподобных вирусов, таких как Jingmen tick virus (JMTV), который впервые был изолирован из клещей вида *Rhipicephalus microplus*, собранных в китайской провинции Хубэй, и назван в соответствии с географическим местом открытия – регионом Jingmen [5]. Фактически одновременно похожий многокомпонентный флавивирус Guaico Culex virus (GCXV) был обнаружен в комарах рода *Culex* в Перу, Панаме и на острове Тринидад в Карибском море [5, 6].

В дополнение к эктопаразитам генетический материал вируса JMTV (RC27) также удалось определить в плазме крови приматов – красных колобусов (род *Ptilocolobus* (Rochebrune, 1877)), обитающих

в Уганде, а также в сыворотках крови крупного рогатого скота (КРС) и грызунов [5–8]. Предполагается, что JMTV вызвал вспышки лихорадочных заболеваний в Китае и Косово [7, 9, 10]. Это позволило говорить о способности данного вируса преодолевать межвидовые барьеры и эффективно реплицироваться как в эктопаразитах, так и в теплокровных животных.

Впоследствии в различных видах членистоногих и позвоночных были обнаружены другие многокомпонентные флавиподобные вирусы, имеющие устройство генома и механизм реализации генетической информации, схожий с JMTV. Так, Mogiana tick virus (MGTV) был выделен из слонных жёлёз клеща *Rh. microplus* в Бразилии [11]. Чуть позднее на северо-востоке Китая была выявлена циркуляция ранее неизвестного вируса Alongshan (ALSV). Вскоре данный патоген был выделен из клещей *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) на юго-востоке Финляндии и в ряде регионов Российской Федерации [12, 13]. Многокомпонентные флавиподобные вирусы также были обнаружены на территории Турции в клещах *Rh. sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806), *Rh. turanicus* (Pomerantsev, 1936), *Rh. bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895), *Ha. parva* (Neumann, 1897) [14]. Схожий многокомпонентный вирус был детектирован в крови больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой (ККГЛ) в Косово и на юге России [15].

Для организации генома всех флавиподобных вирусов характерно наличие сегментов и генов, кодирующих два ключевых неструктурных вирусных белка, схожих с белками представителей семейства *Flaviviridae* (NS3 и NS5). Многокомпонентные флавиподобные вирусы имеют в своей структуре от 4 (характерно для большинства вирусов, изолированных из клещей, летучих мышей, обезьян и человека) до 5 (встречается у вирусов, выделенных из комаров)

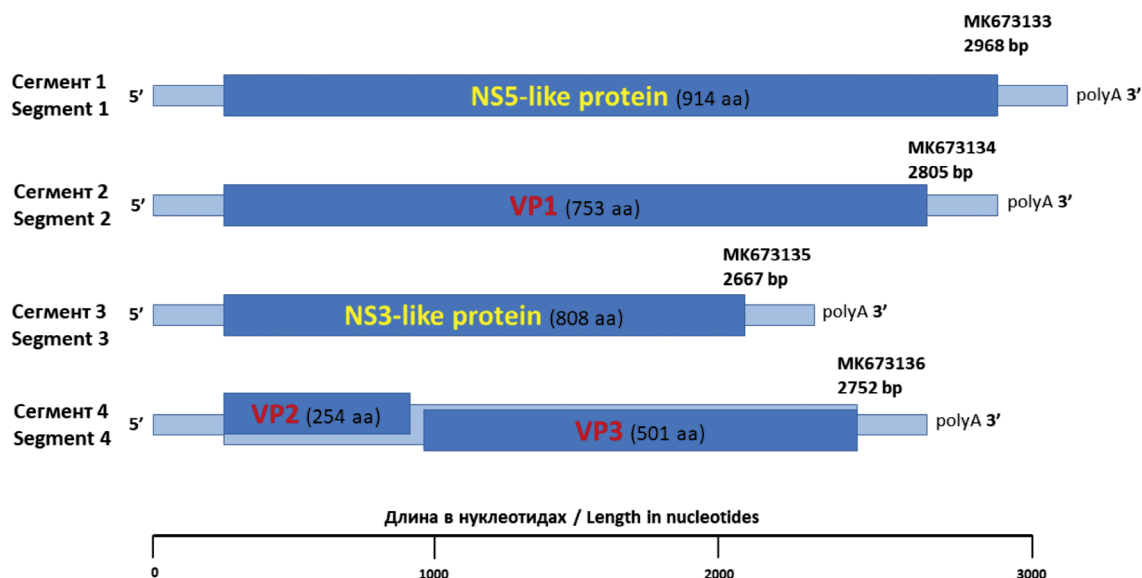


Рис. 1. Схема строения генома многокомпонентных флавиподобных вирусов на примере KITV.

Fig. 1. Scheme of the structure of the genome of multicomponent flavi-like viruses on the example of KITV.

сегментов, которые ограничены с 5'- и 3'-концов не-транслируемыми регионами, а также полиаденилированы (**рис. 1**). Сегмент 1 кодирует неструктурный NS5-like белок, имеющий гомологию с белком NS5 (РНК-зависимая РНК-полимераза) классических представителей семейства *Flaviviridae*. Сегмент 3 кодирует неструктурный белок, имеющий высокую степень гомологии с флавивирусным белком NS3. Белок NS3 наряду с NS5 играет центральную роль в репликации вируса и является одним из наиболее изученных неструктурных белков. N-концевой домен NS3 обладает протеазной активностью, которая необходима для процессинга полипротеина, а С-концевой домен выполняет функцию геликазы и участвует в эспировании и синтезе вирусной РНК. На сегодняшний день хорошо изучена структура белка NS3 у большинства несегментированных флавивирусов, и их анализ показывает высокую гомологию не только в строении, но также в механизмах гидролиза аденозинтрифосфата, распознавания и раскручивания РНК [16]. Структурные белки VP1, VP2, VP3 закодированы во втором и четвертом фрагменте и не имеют известных гомологов среди как флавивирусов, так и других известных на сегодняшний день вирусов. Сегмент 2 кодирует предполагаемый гликопротеин VP1. Белки VP2 (предполагаемый капсидный белок) и VP3 (предполагаемый вирусный мембранный белок) закодированы в сегменте 4 и имеют частично перекрывающиеся рамки трансляции [14]. Также рядом авторов проведены немногочисленные серологические исследования на основе структурных белков VP1 и VP2 с целью изучения циркуляции специфических антител в сыворотках овец и КРС, являющихся прокормителями членистоногих переносчиков [17], или у пациентов с укусом клеща в анамнезе [12].

В настоящее время доказана патогенность многокомпонентных флавиподобных вирусов для сельскохозяй-

ственных животных и человека. Однако эти сведения носят фрагментарный и ограниченный характер. Не исключена вероятность того, что их роль в инфекционной патологии может быть более значимой, чем принято считать. Установление факта того, что многокомпонентные флавиподобные вирусы достаточно широко распространены и обнаружены на территории Азии, Европы, Африки и Америки, также диктует необходимость в продолжении изучения этой группы патогенов.

Имеется предположение, что флавивирусы, переносимые клещами, произошли на Африканском континенте из Кадам-подобного вируса (KADV) около 28,5 тыс. лет назад. В дальнейшем они распространились по территории Европы, Азии и Америки. Вполне вероятно, что африканские многокомпонентные флавивирусы, такие как *Kindia tick virus* (KITV), – наиболее вероятные кандидаты в прещественники современных представителей данной группы патогенов [18].

Ранее на территории Гвинейской Республики при проведении метагеномных исследований из суспензий клещей вида *Rh. geigy*, собранных с КРС на территории провинции Киндиа, впервые был изолирован многокомпонентный флавиподобный вирус, получивший предварительное название *Kindia tick virus* [15, 19]. Было показано, что наибольшую степень гомологии KITV имел с MGTV, выделенным из клещей *Rh. microplus* в Южной Америке.

Уровень различия нуклеотидных/аминокислотных последовательностей KITV с другими представителями сегментированных флавиподобных вирусов составил 7–28/3,1–21,8% (для сегмента 1); 7,7–20,6/3,4–20,3% (для сегмента 2); 2,3–29,3/1,3–20,8% (для сегмента 3) и 0,4–22/0,2–15% (для сегмента 4).

Целью данной работы был дальнейший поиск и молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентных флавиподобных вирусов в искодовых клещах, собранных на территории Гвинейской Республики.

Материалы и методы

Исследования были проведены на базе лаборатории Российско-гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, который расположен на территории Исследовательского института прикладной биологии в г. Киндиа, Гвинейская Республика [20].

Сбор клещей проводился в период с апреля по май 2021 г. при осмотре взрослых особей сельскохозяйственных животных, находящихся на свободном выпасе на территории префектур Койя, Дюбрека, Форекария, Киндиа, Телимеле провинции Киндиа (рис. 2). Предварительно полученный и обработанный материал был протестирован методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием наборов реагентов российского производства для выявления маркеров возбудителей: РНК вируса ККГЛ «АмплиСенс ССНФV-FL»; РНК вируса клещевого энцефалита, ДНК *Borrelia burgdorferi* sl, *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris* и ДНК *Anaplasma phagocytophilum* «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL»; ДНК *Coxiella burnetii* «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», ДНК риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки *Rickettsia* spp. «Набор реагентов АмплиСенс *Rickettsia* spp. SFG-FL»

(ФБУН «ЦНИИЭ», Россия), а также ДНК *Francisella tularensis* «Ген *Francisella tularensis*-РГФ» (ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», Россия). Для последующих исследований были выбраны пробы, в которых присутствие вышеупомянутых патогенов не было обнаружено.

Всего для исследования было собрано, сформировано и проанализировано 324 индивидуальные пробы клещей, относящихся к видам *Am. variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus* и *Rh. senegalensis*. Эктопаразитов дважды отмывали 70% этанолом для удаления внешних загрязнений и наружной микрофлоры, после чего хранили при температуре -20°C до проведения дальнейших исследований. Видовую принадлежность клещей устанавливали по морфологическим характеристикам согласно определителю [21] с использованием бинокля с увеличением $\times 56$ с последующей таксономической верификацией нуклеотидной последовательности фрагмента гена рибосомальной РНК.

Обработку исследуемых проб проводили с помощью лабораторного гомогенизатора TissueLyser II (QIAGEN, Германия) в 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера. Вирусную РНК выделяли из 100 мкл клещевой суспензии методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA™ Reagent («Евроген», Россия). кДНК по-

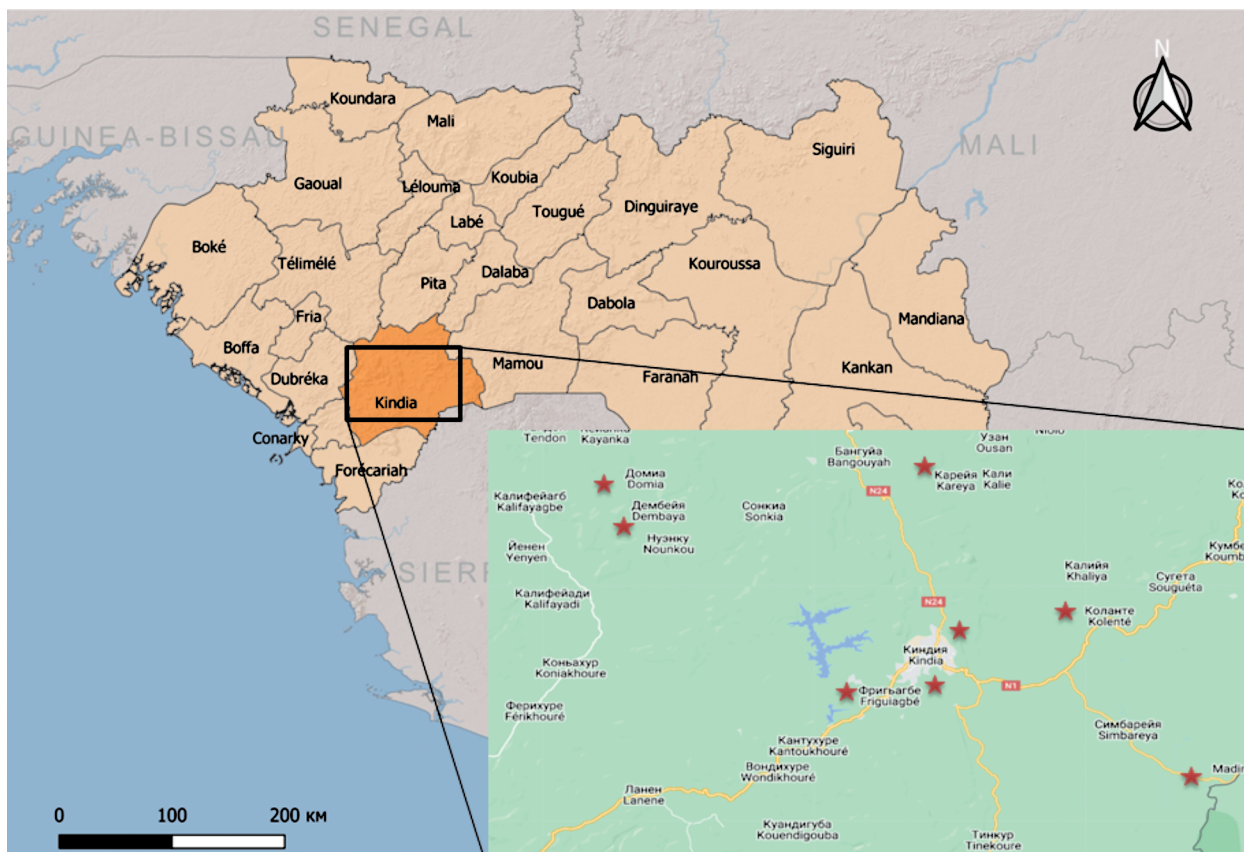


Рис. 2. Территории префектуры Киндиа (Гвинейская Республика), где были собраны пробы для исследований. Места сбора клещей обозначены звездочками.

Fig. 2. Territories of Kindia Prefecture (Republic of Guinea) where samples were collected for research. Tick collection sites are marked with asterisks.

лучали в реакции обратной транскрипции с помощью коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкциям производителей.

Скрининг исследуемых образцов на наличие генетического материала KITV осуществляли методом ПЦР с парой праймеров KITV1_bF/KITV1_bR, комплементарных сегменту 1 (NS5-подобный ген, сегмент 1) (табл. 1). Для положительных образцов были получены ампликоны, частично перекрывающие все 4 сегмента генома KITV. Реакцию амплификации ставили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл двукратной ПЦР-смеси («БиоЛабМикс», Россия), 0,2 мкМ каждого из праймеров и 1,5 мкл кДНК. Праймеры, используемые в данной работе, и ожидаемая длина ампликонов представлены в табл. 1. ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) согласно следующей программе амплификации: активация полимеразы при температуре 95 °С – 5 мин; далее 38 последовательных циклов: денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг праймеров при 57 °С – 20 с, элонгация при 72 °С – 45 с, финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. Продукты реакции учитывали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл.

Нуклеотидные последовательности полученных ПЦР-фрагментов определяли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific, США) с последующим анализом на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы изучали с помощью программы SeqMan (DNASTar, США).

Филогенетический анализ проводили с помощью пакета программ MEGA X методом максимального правдоподобия с использованием трёхпараметриче-

ской модели эволюции Тамуры T92 [22]. Показатель статистической надёжности узлов филогенетического дерева рассчитывался с помощью бутстреп-анализа для 1000 случайных реплик.

Частичные нуклеотидные последовательности сегментов изолятов KITV, выявленных в данной работе, были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами ОК345271–ОК345279 – для сегмента 1, ОК345280–ОК345288 – для сегмента 2, ОК345289–ОК345297 – для сегмента 3, ОК345298–ОК345306 – для сегмента 4.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании РНК KITV была обнаружена в 9 пробах. В последующем для всех изолятов определены частичные нуклеотидные последовательности каждого из сегментов: 1-й – 1609 пар нуклеотидов (п.н.), 2-й – 980 п.н., 3-й – 1114 п.н. и 4-й – 1116 п.н. Также в работе показано, что различия нуклеотидных и аминокислотных последовательностей KITV, по сравнению с другими представителями сегментированных флавиподобных вирусов, составили: для сегмента 1 – от 7 до 28% и от 3,1 до 21,8%; для сегмента 2 – от 7,7 до 20,6% и от 3,4 до 20,3%; для сегмента 3 – от 2,3 до 29,3% и от 1,3 до 20,8% и для сегмента 4 – от 0,4 до 22% и от 0,2 до 15% соответственно (табл. 2).

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей, выделенных в 2021 г. для сегмента 1, соста-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе

Table 1. Oligonucleotide primer used in the work

Ген-мишень Target gene	Праймер Primer	Структура праймера Primer sequence	Температура отжига, °С T annealing, °C	Длина ампликона, п.н. Amplicon length, bp
Internal transcribed spacer 2	Boophits 2F	GCCGTCGACTCGTTTTGA	57	825
	Boophits 2R	TCCGAACAGTTGCGTGATAAA		
Сегмент 1 KITV Segment 1	KITV1_aF	TGAAGAACGTC AAGCCCTGG	58	602
	KITV1_aR	GCTGACCCACGAACCTGTTT		
	KITV1_bF	AAAGAAGGGCTCTGAGGGC	58	607
	KITV1_bR	CTTATACAGGCCCTGTCCCG		
	KITV1_cF	GAAGTGCGGATGGAGCGTAG	58	619
	KITV1_cR	ACCTGTGGGAGCAGAAGGAT		
Сегмент 2 KITV Segment 2	KITV2_aF	AACCTTTGGGAGTGACCAGGG	58	617
	KITV2_aR	GATAAGGCCGTCAGAGCGAG		
	KITV2_bF	CAGGGACGAGACATTGCCAA	58	555
	KITV2_bR	CCGTGGAGTAGTGGACCGTA		
Сегмент 3 KITV Segment 3	KITV3_aF	AATTGGAGAGGCAGAGGGGA	58	609
	KITV3_aR	GACCTTGTTGACCAGGTCA		
	KITV3_bF	GGCAACTCATGACCTGGTCC		
	KITV3_bR	AGGACCACTGTGGCGTAGT	58	558
Сегмент 4 KITV Segment 4	KITV4_aF	CCCTACCAGGCCTGATACGA		
	KITV4_aR	TAGTAGCGGGCCAGGTTGTA	58	615
	KITV4_bF	GCGGAGAGAGAGAAAACGCA		
	KITV4_bR	ACAGGTTACGAACACAGCC	58	617

Таблица 2. Выявление РНК КИТВ среди разных видов иксодовых клещей методом ОТ-ПЦР
Table 2. Detection of KITV RNA among different species of ticks by RT-PCR

Вид клеща Species of ticks	Количество экземпляров (из них положительных) Number of samples (of which positive)	Встречаемость КИТВ Prevalence of KITV
<i>Am. variegatum</i>	197 (0)	0% (95% CI 0–1,9)
<i>Rh. geigy</i>	49 (6)	12,2% (95% CI 5,7–24,2)
<i>Rh. annulatus</i>	45 (2)	4,4% (95% CI 1,2–14,8)
<i>Rh. decoloratus</i>	30 (1)	3,3% (95% CI 0,7–16,1)
<i>Rh. senegalensis</i>	3 (0)	0% (95% CI 0–46,2)
Всего Total	324 (9)	2,8% (95% CI 1,5–5,1)

вил 98,5–100%; для сегмента 2 – 99,6–100%; для сегментов 3 и 4 – 99,5–100%. При сравнении с изолятом КИТВ/2017/1, полученным в 2017 г., этот показатель был 98,7–99,2%, по сравнению с другими многокомпонентными флавиподобными вирусами колебался от 72 до 90% для фрагмента 1; от 60 до 90% – для фрагмента 2; от 73 до 90% – для фрагмента 3 и от 61 до 90% – для фрагмента 4.

На рис. 3 показано, что все последовательности, выделенные в 2021 г., кластеризуются в одну группу вместе с изолятом КИТВ/2017/1 [18]. Обращает на себя внимание тот факт, что филогенетические деревья выявленных изолятов КИТВ и других многокомпо-

нентных вирусов, построенные по каждому из сегментов, имеют практически одинаковую топологию. В 2021 г. КИТВ был обнаружен в трёх видах иксодовых клещей, но последовательности были весьма консервативны, и существенных отличий, связанных с таксономической разницей эктопаразитов, выявлено не было.

Рядом авторов показано, что многокомпонентные флавиподобные вирусы подразделяются как минимум на три субклады [23]. Вирус КИТВ и его выявленные в ходе исследования изоляты при проведении анализа по каждому из четырёх сегментов генома однозначно кластеризуются в субкладу А, куда также относятся МГТВ (Бразилия), JMТV (Китай, Азия) и вариант JMТV/primate/Uganda (Африка). Субклада В включает изоляты JMТV с Антильских островов и варианты JMТV/human/Kosovo (МН133313–МН133316), выделенные от больных КГЛ. Субклада С объединяет изоляты JMТV из Франции (МN095527–МN095530) и вирус Alongshan, обнаруженный у домашних животных и человека в Китае и позднее выявленный в Европе и России.

Можно предположить, что для вирусов с многокомпонентным геномом характерны события перегруппировки/рекомбинации, которые могут вносить вклад в их генетическую изменчивость. Однако имеющиеся данные говорят о том, что геном JMТV чрезвычайно стабилен среди позвоночных и беспозвоночных, что позволяет предположить, что вирус уже хорошо адаптирован к обоим хозяевам. Нуклеотидные последовательности различных сегментов представителей этой группы показывают высокую степень гомологии

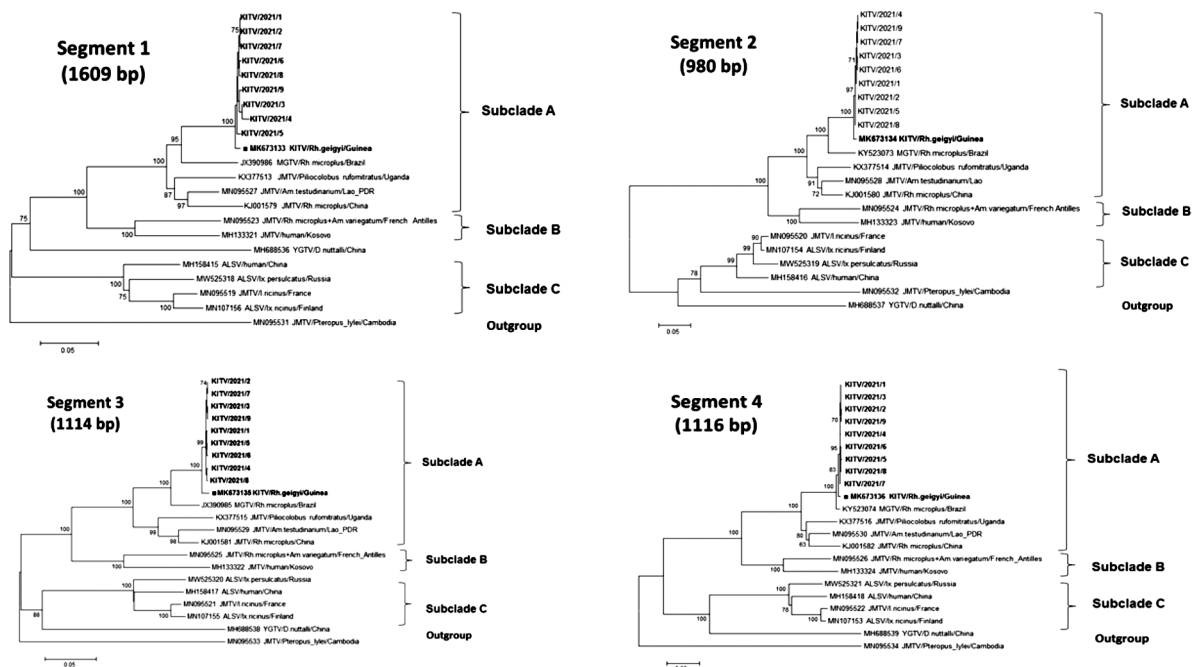


Рис. 3. Филогенетический анализ изолятов КИТВ из индивидуальных иксодовых клещей для всех четырёх сегментов генома.
Fig. 3. Phylogenetic analysis of KITV isolates from individual ixodid ticks for all four genome segments.

среди географически удалённых вирусов, циркулирующих в Европе, Азии, Африке и Южной Америке. Геномный анализ не позволяет определить очевидные мутации, которые могли бы отразить адаптацию вируса к позвоночному или беспозвоночному хозяину. Возможно, такую консервативность геномов можно связать с распространением одного и того же вируса в различных ареалах. Для более полного понимания такого широкого распространения вируса необходимо исследовать роль перелётных птиц, грызунов и, возможно, летучих мышей.

Заключение

В настоящем исследовании показано, что Kindia tick virus является первым сегментированным флавиподобным вирусом, обнаруженным на территории Западной Африки. Генетический материал KITV получен при исследовании иксодовых клещей видов *Rh. geigyi*, *Rh. annulatus* и *Rh. decoloratus*, собранных с домашнего скота, уровень инфицированности составил 3,3–12,2%. Филогенетический анализ четырёх фрагментов KITV показал высокий уровень их гомологии (98,5–100%) с ранее обнаруженными изолятами, выделенными в Гвинейской Республике в 2017 г., и позволил кластеризовать их в субкладу A JMTV-подобных вирусов.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости проведения дальнейших исследований по изучению циркуляции KITV на территории Западной Африки, выявлению видов носителей/переносчиков и определению степени патогенности для человека и животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karesh W.B., Dobson A., Lloyd-Smith J.O., Lubroth J., Dixon M.A., Bennett M., et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*. 2012; 380(9857): 1936–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
2. Gaunt M.W., Sall A.A., Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhibanlian T.I., Gould E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1867–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>
3. Kitchen A., Shackelton L.A., Holmes E.C. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*. 2015; 7(4): 1927–59. <https://doi.org/10.3390/v7041927>
5. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
6. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2nd, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
7. Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
8. Yu Z.M., Chen J.T., Qin J., Guo J.J., Li K., Xu Q.Y., et al. Identification and characterization of Jingmen tick virus in rodents from

- Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 84: 104411. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104411>
9. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakya L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine*. 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
 10. Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1805068>
 11. Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., Gardinassi L.G., Garcia G.R., Brandão L.G., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2014; 109(1): 38–50. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
 12. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes Ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill*. 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.27.1900394>
 13. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
 14. Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., Emanet N., Brinkmann A., Nitsche A., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses*. 2019; 11(11): 1071. <https://doi.org/10.3390/v11111071>
 15. Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенцова А.О., Зайковская А.В., Вольнкина А.С., Котенев Е.С. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020; (2): 116–21. <https://doi.org/10.15690/vramn1192>
 16. Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ*. 2020; 7(Pt 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/s2052252520003632>
 17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors*. 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
 18. Henderson B.E., Tukei P.M., McCrae A.W., Ssenkubuge Y., Mugo W.N. Virus isolations from Ixodid ticks in Uganda. II. Kadam virus – a new member of arbovirus group B isolated from Rhipicephalus pravus Dontiz. *East Afr. Med. J.* 1970; 47(5): 273–6.
 19. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
 20. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л. и др. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015>
 21. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Agustín Estrada-Peña A., Horak I., Latif A.A., et al. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Edinburgh: Bioscience Reports; 2003.
 22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 23. Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere*. 2019; 4(6): e00645-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00645-19>

REFERENCES

1. Karesh W.B., Dobson A., Lloyd-Smith J.O., Lubroth J., Dixon M.A., Bennett M., et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*. 2012; 380(9857): 1936–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)

2. Gaunt M.W., Sall A.A., Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhivaniyan T.I., Gould E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1867–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>
3. Kitchen A., Shackelton L.A., Holmes E.C. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses.* 2015; 7(4): 1927–59. <https://doi.org/10.3390/v7041927>
5. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
6. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2nd, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
7. Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthobornavirus in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
8. Yu Z.M., Chen J.T., Qin J., Guo J.J., Li K., Xu Q.Y., et al. Identification and characterization of Jingmen tick virus in rodents from Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 84: 104411. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104411>
9. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine.* 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
10. Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1805068>
11. Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., Gardinassi L.G., Garcia G.R., Brandão L.G., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109(1): 38–50. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
12. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes Ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.27.1900394>
13. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
14. Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., Emanet N., Brinkmann A., Nitsche A., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses.* 2019; 11(11): 1071. <https://doi.org/10.3390/v11111071>
15. Ternovoy V.A., Gladysheva A.V., Sementsova A.O., Zaykovskaya A.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., et al. Detection of the RNA for new multicomponent virus in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Russia. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2020; (2): 116–21. <https://doi.org/10.15690/vramn1192> (in Russian)
16. Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ.* 2020; 7(Pt 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/s2052252520003632>
17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors.* 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
18. Henderson B.E., Tukei P.M., McCrae A.W., Ssenkubuge Y., Mugo W.N. Virus isolations from Ixodid ticks in Uganda. II. Kadam virus – a new member of arbovirus group B isolated from Rhipicephalus pravus Döntiz. *East Afr. Med. J.* 1970; 47(5): 273–6.
19. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
20. Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., et al. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015> (in Russian)
21. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Agustin Estrada-Peña A., Horak I., Latif A.A., et al. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species.* Edinburgh: Bioscience Reports; 2003.
22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
23. Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere.* 2019; 4(6): e00645-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00645-19>