

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>

Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг.

Батурин А.А.[✉], Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Аннотация

Цель. Изучение распространённости генотипов и геновариантов вируса Западного Нила (ВЗН) на территории юга России в 2010–2019 гг.

Материалы и методы. Для исследования использовали 311 инфицированных ВЗН образцов биологического материала от больных, переносчиков и резервуаров инфекции. Типирование ВЗН проводили посредством сконструированных 3 пар праймеров и 3 зондов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени и секвенированием участка генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующего 5'-нетранслируемой области и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок. Анализ результатов секвенирования проводили с помощью программы «Nucleotide BLAST» (NCBI).

Результаты. Из 311 РНК-изолятов ВЗН 15 (4,82%) были отнесены к генотипу 1 (из Астраханской и Волгоградской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Татарстан), 285 (91,64%) — к генотипу 2 (из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, республик Калмыкия и Крым) и 11 (3,54%) — к генотипу 4 (из Волгоградской области, республик Калмыкия и Крым). Отмечено выраженное преобладание по частоте встречаемости вируса генотипа 2. Установлено, что выявленные изоляты возбудителя генотипа 1 относятся к астраханскому геноварианту, генотипа 2 — к российскому и европейскому геновариантам. Обнаружены ранее не встречавшиеся варианты ВЗН генотипов 1 и 4.

Заключение. В последнее десятилетие ВЗН генотипа 2 является доминирующим для юга европейской части России. Наиболее распространён российский вариант, его ареал расширяется. Циркуляция различных генетических линий ВЗН на территории России свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения их распространения, а также совершенствования диагностических методов и тест-систем для выявления и дифференциации штаммов возбудителя.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, генотип, Референс-центр

Этическое утверждение. Исследование проведено при информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010), протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике Волгоградского научно-исследовательского противочумного института (протокол № 3 от 05.04.2019).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Батурин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Шпак И.М., Бородай Н.В., Король Е.В., Тетерятникова Н.Н. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):308–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>

Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019

Artem A. Baturin[✉], Galina A. Tkachenko, Margarita L. Ledeneva, Lyudmila V. Lemasova, Ol'ga S. Bondareva, Il'ya D. Kaysarov, Ivan M. Shpak, Natal'ya V. Boroday, Ekaterina V. Korol', Natal'ya N. Teteryatnikova

Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia

Abstract

Aim. A study of the prevalence of West Nile virus (WNV) genetic lineages and genovariants in the south of European Russia between 2010 and 2019.

Materials and methods. The study was carried out on 311 WNV containing biological samples from patients, vectors and reservoirs of infection. WNV typing was carried out using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction with designed three pairs of primers and three probes and by the sequencing of the 277 bp WNV genome region corresponding to the 5'-untranslated region and locus of the polyprotein gene encoding the capsid protein C. Sequencing results were analyzed using the Nucleotide BLAST software (NCBI).

Results. As a result of typing, out of 311 WNV RNA isolates taken for the study, 15 (4.82%) were assigned to lineage 1 (from Astrakhan and Volgograd regions, Krasnodar and Stavropol Territories, Republic of Tatarstan), 285 (91.64%) to lineage 2 (from Astrakhan, Volgograd, Voronezh, Kursk, Lipetsk, Penza, Rostov and Saratov regions, Krasnodar and Stavropol Territories, Republics of Kalmykia and Crimea), and 11 (3.54%) to lineage 4 (from the Volgograd region, Republics of Kalmykia and Crimea). The predominance of viral lineage 2 was demonstrated. The identified isolates of the viral lineage 1 belonged to the «Astrakhan» variant, isolates of lineage 2 belonged to «Russian» and «European» variants. Previously uncommon WNV variants of lineages 1 and 4 were also found.

Conclusion. Lineage 2 of WNV prevailed in the south of European Russia in the last decade. The «Russian» variant is most common and its area is expanding. The circulation of various WNV genetic lineages in Russia indicates the need for further study of their spread and improving diagnostic methods and test systems for identifying and differentiating pathogen strains.

Keywords: West Nile virus, genetic lineage, Reference Center

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. 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). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Volgograd Research Institute for Plague Control (protocol 3, 05.04.2019).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Baturin A.A., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Lemasova L.V., Bondareva O.S., Kaysarov I.D., Shpak I.M., Boroday N.V., Korol' E.V., Teteryatnikova N.N. Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):308–318.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи, имеющая глобальное распространение. Клинические проявления ЛЗН разнообразны и варьируют от бессимптомного течения до развития тяжёлых осложнений в форме менингита и менингоэнцефалита [1, 2]. Тяжесть заболевания может быть связана как с потенциалом вирулентности возбудителя, так и с иммунным статусом инфицированного. Причиной заболевания является вирус Западного Нила (ВЗН, West Nile virus), который принадлежит семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита.

Геномы различных штаммов ВЗН характеризуются значительной генетической вариабельно-

стью. По современным данным, изоляты ВЗН можно разделить на 9 генотипов (генетических линий) [3, 4]. Дифференциация ВЗН на генотипы основана на сравнительном анализе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома. Генетическая дистанция между генотипами ВЗН составляет 18–27% [5]. В России достоверно зарегистрирована циркуляция генотипов 1, 2 и 4 ВЗН [6].

К генотипу 1 относят изоляты ВЗН, близкие к штамму Eg101, выделенному в 1951 г. из крови клинически здорового ребёнка в Египте (NCBI GenBank: AF260968), к генотипу 2 — изоляты, близкие к прототипному штамму B956, выделенному в 1936 г. из крови больной женщины в Уганде (NCBI Reference Sequence: NC_001563; GenBank:

M12294). Для ВЗН генотипа 4 прототипным является штамм LEIV-Krd88-190, выделенный от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus*, собранных в 1988 г. в предгорных районах Северного Кавказа (NCBI GenBank: AY277251) [7].

Штаммы ВЗН генотипов 1 и 2 являются патогенными для человека. Природными резервуарами ВЗН генотипов 1 и 2 служат птицы, а в качестве основных переносчиков выступают орнитофильные комары. Поддержанию циркуляции вируса в природных очагах ЛЗН способствуют также иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи. Человека, лошадей и прочих млекопитающих рассматривают в качестве тупиковых хозяев ВЗН генотипов 1 и 2, поскольку уровень вирусной нагрузки у них является недостаточным для инфицирования переносчиков [8]. Известными на сегодняшний день резервуарами ВЗН генотипа 4 являются озёрные лягушки *Rana ridibunda*, а основными переносчиками — комары *Uranotaenia unguiculata*. Патогенность ВЗН генотипа 4 для млекопитающих не доказана [9, 10].

В России с 1999 по 2003 г. на территориях Волгоградской и Астраханской областей была установлена циркуляция двух родственных генетических вариантов ВЗН генотипа 1 — волгоградского и астраханского [9]. Однако в 2004 г. на территории Ростовской области, а в 2007 и в 2010 гг. на территории Волгоградской области вспышки ЛЗН были вызваны российским геновариантом ВЗН генотипа 2 [9]. Генотип 4 на территории России выделяли от клещей *Dermacentor marginatus* в Краснодарском крае, от комаров *Anopheles hyrcanus* в Астраханской области, от комаров *Uranotaenia unguiculata* и озерных лягушек *Rana ridibunda* в Волгоградской области [9, 10]. С 2008 г. на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН, одной из главных задач которого является изучение молекулярно-генетических свойств штаммов ВЗН, выделяемых на территории России.

Целью данной работы являлось изучение распространённости генотипов и геновариантов ВЗН на территории юга России в 2010–2019 гг.

Материалы и методы

Для исследования использовали инфицированные ВЗН образцы клинического, аутопсийного и полевого материала, полученные из Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН. В качестве клинических образцов использовали пробы цельной крови, сыворотки и плазмы крови, мочи и ликвора. Образцами аутопсийного материала служили ткани головного мозга и внутренних органов больных, умерших в результате развития нейроинвазивных форм ЛЗН. В качестве полевого материала использовали пробы от птиц и комаров. От птиц

отбирали головной мозг и внутренние органы. Комаров распределяли на пулы по видам. Непосредственно перед выделением РНК образцы тканей человека и животных, а также пулы членистоногих гомогенизировали в физиологическом растворе с помощью гомогенизатора «Precellys 24» («Vertin Technologies»).

Выделение РНК осуществляли с использованием коммерческих наборов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкциями производителя.

Наличие РНК ВЗН в пробах подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Типирование ВЗН проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») посредством разработанных 3 пар праймеров и 3 зондов, специфично выявляющих генотипы 1, 2 и 4 ВЗН:

- *WNV-1type-F* 5'-GCGTGTGTGCCTTGATTG-3',
WNV-1type-R 5'-GTTCACACCTCCATCG-3',
WNV-1type-P 5'-(FAM)CCTGTGTGGCGTTCTT CAGGTTACAGG(BHQ1)-3' — для выявления генотипа 1 (патент РФ № 2715625 от 02.03.2020);
- *WNV-2type-F* 5'-GCTATGCTGAGTCTGATTG-3',
WNV-2type-R 5'-CCTCTCCATGTCCAG-3',
WNV-2type-P 5'-(ROX)CCCAATACGTTTCGTG TTGGCTCTTTGGG(BHQ2)-3' — для выявления генотипа 2 (патент РФ № 2715617 от 02.03.2020);
- *WNV-4type-F* 5'-GCGTGTGTGCCTTAATAG-3',
WNV-4type-R 5'-CACCTCCATCTGTCC-3',
WNV-4type-P 5'-(JOE)CTCGTGGCCYTG YTGAC GTTTTTCACGAG(BHQ1)-3' — для выявления генотипа 4 (патент РФ № 2737396 от 30.11.2020).

Олигонуклеотиды конструировали с помощью программ «Oligo 7», «PerlPrimer v1.1.21». Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени оценивали по наличию или отсутствию пересечения кривой накопления флюоресценции с пороговой линией, что определялось значением порогового цикла (cycle threshold — Ct). Положительными считали образцы, для которых значение Ct не превышало 33.

Секвенирование положительных образцов с высокой концентрацией вирусной РНК проводили по участку генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующему 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок (protC), на автоматическом генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» («Applied Biosystems»). Секвенированный фрагмент по локализации соответствовал позиции с 34 по 310 нуклеотид в геноме ВЗН (NCBI Reference Sequence:

NC 001563). Ампликоны получали методом ОТ-ПЦР со специфичными праймерами, фланкирующими данный участок генома, с использованием амплификатора «Терцик» («НПО ДНК-Технология»). Для проведения реакции циклического секвенирования использовали набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems»).

Результаты секвенирования анализировали, сравнивая полученные нуклеотидные последовательности с таковыми из базы данных GenBank (NCBI) с помощью программы «Nucleotide BLAST» (NCBI). Филогенетическое дерево строили методом Neighbor-joining с использованием модели для подсчёта матрицы расстояний Kimura 2 в компьютерной программе «MEGA 7» (Pennsylvania State University).

Результаты

В период с 2010 по 2019 г. в Референс-центре по мониторингу за возбудителем ЛЗН проведено исследование 7922 проб, из них в 589 случаях обнаружена РНК ВЗН. Для определения генотипа ВЗН отобрано 311 положительных образцов. Пробы с низкой вирусной нагрузкой ($Ct > 30$) были исключены из исследования.

В результате проведённого типирования методом ОТ-ПЦР из 311 РНК-изолятов ВЗН, взятых для исследования, 15 (4,82%) были отнесены к генотипу 1, 285 (91,64%) — к генотипу 2, и 11 (3,54%) — к генотипу 4 (табл. 1, 2).

ВЗН генотипа 1 выявлен у больных из Астраханской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Татарстан, а также в пулах комаров, отловленных на территории Волгоградской области.

ВЗН генотипа 2 обнаружен в клиническом материале от больных из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Крым. При исследовании образцов полевого материала генотип 2 ВЗН установлен для пулов комаров, отловленных на территории Астраханской и Волгоградской областей, Республики Калмыкия и проб суспензий органов птиц, отловленных на территориях Волгоградской и Саратовской областей.

ВЗН генотипа 4 обнаружен в пробах суспензий пулов комаров, отловленных на территориях Волгоградской области, Республики Калмыкия и Республики Крым.

Для определения циркулировавших геновариантов ВЗН было проведено секвенирование 6 РНК-изолятов ВЗН генотипа 1 (ASTRAKHAN 925-2012; ASTRAKHAN 143-2016; ASTRAKHAN 612-2018; STAVROPOL 810-2012; TATARSTAN 435-2018; VOLGOGRAD 1115-2016), 12 РНК-изолятов ВЗН генотипа 2 (ROSTOV 1471-2012; ROSTOV 633-2018; SARATOV 1367-2012; SARATOV 2954-

2013; SARATOV 403-2015; VOLGOGRAD 613-2010; VOLGOGRAD 410-2012; VOLGOGRAD 2481-2013; VOLGOGRAD 833-2014; VOLGOGRAD 2924-2014; VOLGOGRAD 703-2018; VORONEZH 718-2018) и 6 РНК-изолятов ВЗН генотипа 4 (CRIMEA-1078-2018; KALMYKIA-958-2018; KALMYKIA-960-2018; KALMYKIA-962-2018; KALMYKIA-971-2018; VOLGOGRAD-973-2018).

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования ВЗН генотипа 1, выявленного на территории Астраханской и Волгоградской областей, а также Ставропольского края, была установлена высокая степень гомологии (99,28–99,64%) с последовательностью штамма ВЗН генотипа 1, циркулировавшего на территории Астраханской области в 1999 г. (Ast99-901, GenBank: AY278441). На дендрограмме данные изоляты кластеризовались в отдельную группу, представляющую собой астраханский геновариант ВЗН генотипа 1 (рис. 1). Полученные результаты коррелировали с данными сравнительного анализа нуклеотидной последовательности (5'-UTR-protC) изолята ВЗН 141_Astr_03_M, выделенного в 2003 г. специалистами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора из пула комаров, отловленных на территории Астраханской области. Данный изолят был идентичен клиническому штамму ВЗН Ast99-901 [6].

Единичный случай ЛЗН 2018 г. в Татарстане, причиной которого было инфицирование вирусом генотипа 1 (изолят ВЗН TATARSTAN 435-2018), являлся завозным из Индии. На дендрограмме данный изолят формировал отдельную ветвь и не входил в группу астраханских штаммов. Гомология полученной нуклеотидной последовательности изолята из Татарстана с аналогичными последовательностями для астраханского (Ast99-901, GenBank: AY278441) и индийского (68856-ICDC-4, GenBank: KT163243) штаммов составляла 98,56 и 96,75% соответственно.

Секвенирование изолятов генотипа 2, выделенных в разных регионах, показало их генетическую неоднородность, выражающуюся в наличии однонуклеотидных замен. Последовательности, полученные для изолятов из Волгоградской, Ростовской и Саратовской областей, обладали гомологией до 99–100% с последовательностями штаммов, циркулировавших на территории Волгоградской области в 2007 г. (Reb_VLG_07_H, GenBank: FJ425721) и на территории Румынии в 2013 г. (Hyalomma/Romania/2013, GenBank: KJ934710). Данные изоляты на дендрограмме составляли ветвь, включившую в себя группу штаммов ВЗН российского геноварианта генотипа 2, характеризующихся наличием полиморфизма по локусу protC, выражающегося в наличии однонуклеотидных замен (рис. 2). Похожие данные были получены А.Е. Платоновым и соавт. в

Таблица 1. Генотипы ВЗН, выявленного у больных с 2010 по 2019 г.
Table 1. Genetic lineages of WNV detected in patients from 2010 to 2019

Регион России Region of Russia	Количество изолятов ВЗН определённого генотипа по годам Number of WNV isolates of a certain genetic lineage by years																							
	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		всего / total			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
Астраханская область Astrakhan Region	-	-	-	-	2 (1)	0	2 (1)	0	-	-	1 (1)	0	1 (1)	0	-	-	1 (1)	1 (0)	0	2 (0)	0	7 (5)	3 (0)	
Волгоградская область Volgograd Region	0	9 (3)	0	9 (0)	0	22 (4)	0	15 (2)	0	3 (0)	-	0	2 (0)	-	-	0	14 (0)	0	10 (1)	0	0	84 (10)	0	
Воронежская область Voronezh Region	-	-	0	1 (0)	0	3 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (1)	0	0	0	0	5 (1)	0
Курская область Kursk Region	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2 (0)	0	0	2 (0)	0
Липецкая область Lipetsk Region	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0	0	3 (0)	0
Пензенская область Penza Region	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0
Ростовская область Rostov Region	-	-	-	-	0	5 (0)	0	1 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4 (1)	0	7 (3)	0	0	17 (4)	0
Саратовская область Saratov Region	-	-	-	-	0	2 (0)	0	20 (0)	0	1 (0)	0	5 (0)	0	53 (0)	-	-	-	-	-	-	-	0	81 (0)	0
Краснодарский край Krasnodar Territory	-	-	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	8 (0)	0	1 (0)	8 (0)	0
Ставропольский край Stavropol Territory	-	-	-	-	1 (1)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	0	1 (0)	1 (1)	1 (1)	2 (0)	0
Республика Крым Republic of Crimea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (0)	-	-	-	0	1 (0)	0
Республика Татарстан Republic of Tatarstan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0)	0	-	-	-	1 (0)	0	0

Примечание. В скобках указано количество больных ЛЗН с летальным исходом. Символом «-» обозначено отсутствие положительных проб.
Note. The number of fatal WNV patients is indicated in brackets. The symbol «-» indicates absence of samples.

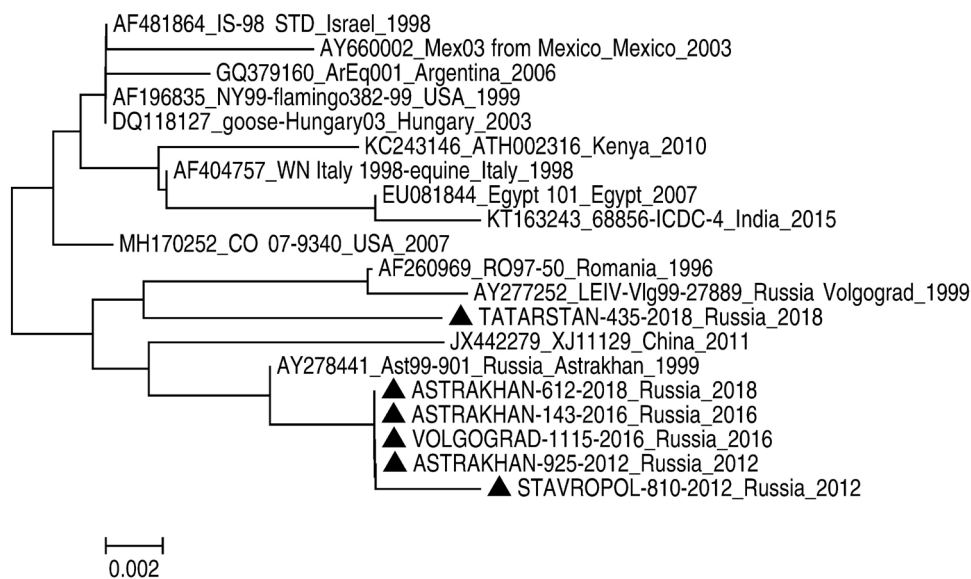


Рис. 1. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 1, построенное методом Neighbor-joining.

Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 1. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 1 built by the Neighbor-joining method.

The triangles mark isolates sequenced in this study.

2010 г. при секвенировании изолятов ВЗН, выявленных в аутоптатах и сыворотках крови пациентов из Волгоградской области. При этом была обнаружена 99,5–99,9% гомология с изолятами ВЗН, выделенными на той же территории в 2007 г. [6].

Для воронежского изолята генотипа 2, выявленного в 2018 г., полученная нуклеотидная последовательность имела 100% гомологию с последовательностями штаммов ВЗН, циркулировавших в течение последних 15 лет на территории Болгарии, Греции, Венгрии и Италии (европейский геновариант), что, возможно, свидетельствует о заносе вируса на территорию России из стран Европы.

При секвенировании РНК-изолятов ВЗН генотипа 4 из Волгоградской области и Республики Калмыкия была выявлена их идентичность волгоградскому изоляту (100% гомология), выделенному в 2006 г. (101_5-06-Uu, GenBank: FJ159129). А изолят ВЗН из Крыма существенно отличался по числу и локализации нуклеотидных замен от остальных, выделенных на территории России в разные годы, и формировал обособленную ветвь на дендрограмме (рис. 3). Гомология последовательности изолята ВЗН из Крыма (CRIMEA-1078-2018) с последовательностями прототипного штамма (LEIV-Krd88-190) и изолята из Волгограда (101_5-06-Uu) составляла 98,56 и 98,19% соответственно.

Обсуждение

Определение генотипа ВЗН является важной составляющей эпидемиологического мониторинга для изучения путей распространения вируса, выявления связи между его генетическими вариантами

и клиническими формами ЛЗН, разработки и совершенствования средств диагностики ЛЗН.

Данные, полученные в работе, свидетельствовали о том, что в 2010–2019 гг. на территории европейской части России циркулировали ВЗН генотипов 1, 2 и 4. Выявленные изоляты возбудителя относились к астраханскому геноварианту генотипа 1, российскому и европейскому геновариантам генотипа 2. Обнаружены новые, ранее не встречавшиеся, варианты ВЗН генотипов 1 и 4. Установлено преобладание генотипа 2 вируса в большинстве субъектов юга России, как в клинических образцах, так и в полевом материале. Генотипы 1 и 4 менее распространены и приурочены к конкретным биотопам.

Основным очагом вируса генотипа 1 на юге европейской части России является дельта Волги, непосредственно расположенная на территории Астраханской области. По данным эпиданамнеза, единственный случай ЛЗН 2018 г. в Татарстане, вызванный вирусом генотипа 1, являлся результатом завоза инфекции из Индии. Выявленные в 2012 г. в Ставрополе и 2016 г. в Волгограде изоляты ВЗН генотипа 1, вероятно, были занесены из Астраханской области, на что указывают данные секвенирования. Циркулировавший на территории Волгоградской области с 1999 по 2003 г. волгоградский геновариант генотипа 1 ВЗН за изучаемый период выявлен не был. Принимая во внимание данные А.Е. Платонова и соавт. [9], вероятно, он был полностью вытеснен или замещён генотипом 2. Вновь выявленные находки ВЗН генотипа 1 в полевом материале, возможно, говорят о новом занесении вируса из

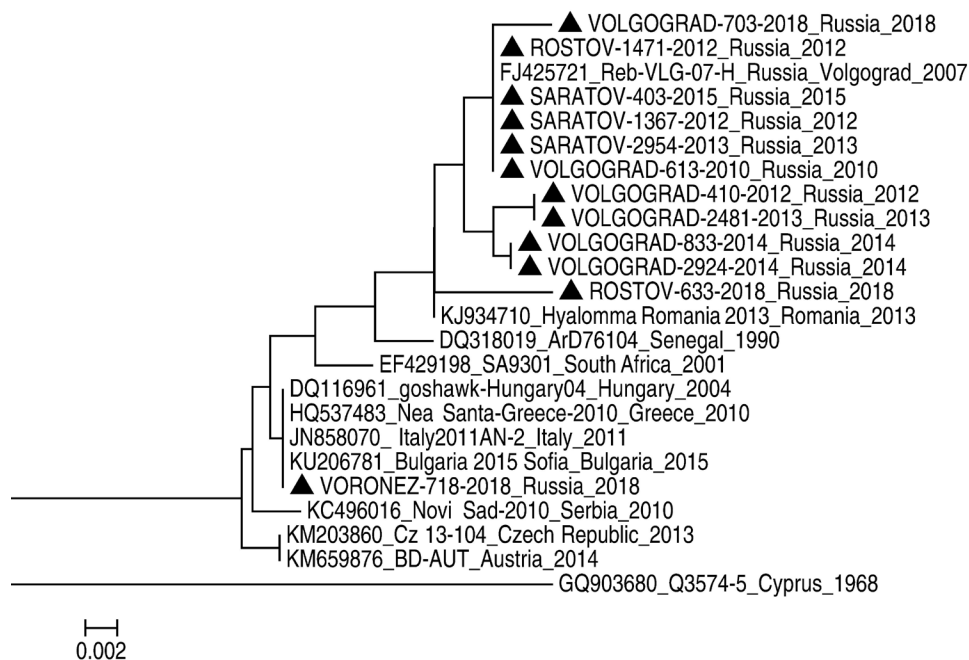


Рис. 2. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 2, построенное методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 2. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 2 built by the Neighbor-joining method. The triangles mark isolates sequenced in this study.

Астраханской области в соседние регионы перелётными птицами. Появление астраханского генотипа генотипа 1 ВЗН в Волгоградской области объясняется особенностями её географического положения, которая на юге и юго-востоке граничит с Астраханской областью.

ВЗН генотипа 2 является доминирующим для всего юга европейской части России. Наиболее распространён российский вариант, изоляты которого, по данным секвенирования, генетически полиморфны. Тем не менее зарегистрирована циркуляция и европейского генотипа ВЗН генотипа 2 в России.

Генотип 4, на наш взгляд, изучен недостаточно. Однако на данный момент можно сказать, что тростниковые заросли Сарпинских озер Волгоградской области и Республики Калмыкия являются биотопами, на территориях которых циркулирует такой достаточно редкий тип ВЗН. Следует отметить, что в 2013 г. на территории Австрии из пула комаров *Ur. unguiculata* был выделен штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 [3]. Однако гомология полученной полногеномной последовательности данного штамма с таковой для российского изолята ВЗН генотипа 4 101_5-06-Uu составляла всего 96,2%. Существенные различия в гомологии заставили авторов отнести штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 к отдельному генотипу 9 [3].

Широкое распространение ВЗН генотипа 2, наблюдаемое в изучаемый период на юге России, имело место и в странах Европы. Так, во время крупной

вспышки ЛЗН 2010 г. на территории Греции в пуле комаров *Culex pipiens*, отловленных в окрестностях города Неа Санта, методом секвенирования был установлен генотип 2 ВЗН. Анализ полученной нуклеотидной последовательности показал высокую степень гомологии с последовательностью штамма, выделенного в Венгрии в 2004 г. [11]. В августе 2013 г. из клеща *Hyalomma marginatum marginatum*, собранного с певчего дрозда в дельте Дуная на территории Румынии, был выделен ВЗН генотипа 2. Результаты секвенирования показали, что данный штамм является генетически родственным российскому штамму ВЗН Reb_VLG_07_H, выделенному в

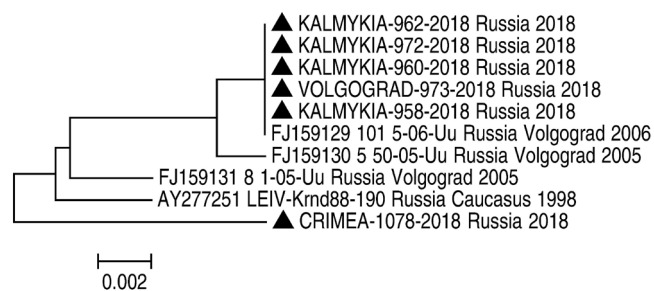


Рис. 3. Филогенетическое дерево по локусу 5'-UTR-protC ВЗН генотипа 4, построенное методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены изоляты, секвенированные в ходе работы.

Fig. 3. The phylogenetic tree based on 5'-UTR-protC locus of WNV lineage 4 built by the Neighbor-joining method. The triangles mark isolates sequenced in this study.

2007 г. в Волгограде [12]. В том же году были обнаружены и выделены 4 практически идентичных штамма ВЗН генотипа 2 от комаров *Culex modestus*, собранных в Южной Моравии (Чехия). Филогенетический анализ показал, что выделенные штаммы ВЗН тесно связаны с австрийскими, итальянскими и сербскими штаммами [13]. ВЗН генотипа 2 в дальнейшем выявляли также на территориях Австрии, Венгрии, Болгарии, Германии, Италии и Испании [14–21]. Тем не менее наряду с генотипом 2 в Европе за последние 10 лет регистрировали случаи ЛЗН, вызванные ВЗН генотипа 1. Так, в осенний период 2011 г. на острове Сардиния (Италия) были зарегистрированы 9 случаев заболевания ЛЗН. Методом секвенирования у 3 больных удалось установить наличие ВЗН генотипа 1, а у одного — генотипа 2 [22].

Приведённые данные указывают на то, что в последнее десятилетие ВЗН генотипа 2 является наиболее распространённым на территории Европейского континента. Идёт расширение его ареала.

Таким образом, циркуляция различных генетических линий ВЗН на территории России свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения их распространения, а также совершенствования диагностических методов и тест-систем для выявления и дифференциации штаммов возбудителя.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(2): 4–9.
2. Sejvar J. West Nile Virus Infection. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(3): E110-0021-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.E110-0021-2016>
3. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2119–22. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
4. Жуков К.В., Топорков А.В., Викторов Д.В. Эпидемиологические аспекты и современная эволюция глобально распространяющихся арбовирусов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(6): 94–102. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102>
5. Анищенко М., Щелканов М.Ю., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Антонов В.А., Джаркенов А.Ф. и др. Молекулярные маркеры патогенности вируса Западного Нила. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(1): 4–10.
6. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса Западного Нила. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 29(1): 31–7.
7. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
8. Топорков А.В., ред. *Лихорадка Западного Нила*. Волгоград: Волга-Пресс; 2017.
9. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М., Русакова Н.М. и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 88(2): 29–37.
10. Львов Д.Н., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф., Галкина И.В., Колобухина Л.В., Аристова В.А. и др. Популяционные взаимодействия вируса Западного Нила (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) с членистоногими переносчиками, позвоночными животными, людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги, 2001–2006 гг. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(2): 36–43.
11. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vazquez A., Tenorio A., Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(5): 920–2. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>
12. Kolodziejek J., Marinov M., Kiss B.J., Alexe V., Nowotny N. The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in Eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905>
13. Rudolf I., Bakonyi T., Sebesta O., Mendel J., Pesko J., Betasova L., et al. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? *Euro Surveill*. 2014; 19(31): 2–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20867>
14. Jungbauer C., Hourfar M.K., Stiasny K., Aberle S.W., Cadar D., Schmidt-Chanasit J., et al. West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 16–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.003>
15. Nagy A., Ban E., Nagy O., Ferenczi E., Farkas A., Banyai K., et al. Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1797–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
16. Baymakova M., Trifonova I., Panayotova E., Dakova S., Pacenti M., Barzon L., et al. Fatal case of West Nile neuroinvasive disease in Bulgaria. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(12): 2203–4. <https://doi.org/10.3201/eid2212.151968>
17. Ziegler U., Luhken R., Keller M., Cadar D., van der Grinten E., Michel F., et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral. Res.* 2019; 162: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>
18. Holicki C., Ziegler U., Raileanu C., Kampen H., Werner D., Schulz J., et al. West Nile virus lineage 2 vector competence of indigenous culex and aedes mosquitoes from Germany at temperate climate conditions. *Viruses*. 2020; 12(5): 561. <https://doi.org/10.3390/v12050561>
19. Busquets N., Laranjo-Gonzalez M., Soler M., Nicolas O., Rivas R., Talavera S., et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 617–21. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
20. Pacenti M., Sinigaglia A., Franchin E., Pagni S., Lavezzo E., Montarsi F., et al. Human West Nile virus lineage 2 infection: epidemiological, clinical, and virological findings. *Viruses*. 2020; 12(4): 458. <https://doi.org/10.3390/v12040458>
21. Veo C., Ventura C., Moreno A., Rovida F., Percivalle E., Canziani S., et al. Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011–2018. *Viruses*. 2019; 11(9): 814. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
22. Magurano F., Remoli M.E., Baggieri M., Fortuna C., Marchi A., Fiorentini C., et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): E545–7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12018>

REFERENCES

1. L'vov D.K. West Nile fever. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(2): 4–9. (in Russian)

2. Sejvar J. West Nile Virus Infection. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(3): E110-0021-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.E110-0021-2016>
3. Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2119–22. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
4. Zhukov K.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Epidemiological aspects and modern evolution of globally spreading arboviruses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(6): 94–102. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102> (in Russian)
5. Anishchenko M., Shchelkanov M.Yu., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Antonov V.A., Dzharhenov A.F., et al. Pathogenicity of West Nile virus: Molecular markers. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(1): 4–10. (in Russian)
6. Subbotina E.L., Loktev V.B. Molecular evolution of the West Nile virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2014; 29(1): 34–41. (in Russian)
7. L'vov D.K., ed. *Virology Guidelines. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
8. Toporkov A.V., ed. *West Nile Fever [Likhoradka Zapadnogo Nila]*. Volgograd: Volga-Press; 2017. (in Russian)
9. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopenkaya T.A., Fedorova M.V., Kolyasnikova N.M., Rusakova N.M., et al. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(2): 29–37. (in Russian)
10. L'vov D.N., Shchelkanov M.Yu., Dzharhenov A.F., Galkina I.V., Kolobukhina L.V., Aristova V.A., et al. Population interactions of West Nile virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) with arthropod vectors, vertebrates, humans in the middle and low belts of Volga delta in 2001–2006. *Voprosy virusologii.* 2009; 54(2): 36–43. (in Russian)
11. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vazquez A., Tenorio A., Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(5): 920–2. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>
12. Kolodziejek J., Marinov M., Kiss B.J., Alexe V., Nowotny N. The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in Eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007. *PLoS One.* 2014; 9(10): e109905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905>
13. Rudolf I., Bakonyi T., Sebesta O., Mendel J., Pesko J., Betasova L., et al. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? *Euro Surveill.* 2014; 19(31): 2–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20867>
14. Jungbauer C., Hourfar M.K., Stiasny K., Aberle S.W., Cadar D., Schmidt-Chanasit J., et al. West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 16–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.003>
15. Nagy A., Ban E., Nagy O., Ferenczi E., Farkas A., Banyai K., et al. Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1797–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
16. Baymakova M., Trifonova I., Panayotova E., Dakova S., Pacenti M., Barzon L., et al. Fatal case of West Nile neuroinvasive disease in Bulgaria. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(12): 2203–4. <https://doi.org/10.3201/eid2212.151968>
17. Ziegler U., Luhken R., Keller M., Cadar D., van der Grinten E., Michel F., et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res.* 2019; 162: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>
18. Holicki C., Ziegler U., Raileanu C., Kampen H., Werner D., Schulz J., et al. West Nile virus lineage 2 vector competence of indigenous culex and aedes mosquitoes from Germany at temperate climate conditions. *Viruses.* 2020; 12(5): 561. <https://doi.org/10.3390/v12050561>
19. Busquets N., Laranjo-Gonzalez M., Soler M., Nicolas O., Rivas R., Talavera S., et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 617–21. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
20. Pacenti M., Sinigaglia A., Franchin E., Pagni S., Lavezzo E., Montarsi F., et al. Human West Nile virus lineage 2 infection: epidemiological, clinical, and virological findings. *Viruses.* 2020; 12(4): 458. <https://doi.org/10.3390/v12040458>
21. Veo C., Ventura C., Moreno A., Rovida F., Percivalle E., Canziani S., et al. Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011–2018. *Viruses.* 2019; 11(9): 814. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
22. Magurano F., Remoli M.E., Baggieri M., Fortuna C., Marchi A., Fiorentini C., et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): E545–7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12018>

Информация об авторах

Батулин Артем Александрович — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, chemistry1987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Ткаченко Галина Александровна — к.м.н., в.н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Леденева Маргарита Леонтьевна — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Лемасова Людмила Викторовна — к.м.н., с.н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>

Бондарева Ольга Сергеевна — к.м.н., н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Information about the authors

Artem A. Baturin — researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, chemistry1987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Galina A. Tkachenko — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Margarita L. Ledeneva — researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Ludmila V. Lemasova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>

Ol'ga S. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of genodiagnostics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Кайсаров Илья Дмитриевич — н.с. лаб. генодиагностики Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5578-3343>

Шпак Иван Михайлович — к.м.н., н.с. сектора биоинформационного анализа Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Бородай Наталья Владимировна — с.н.с. сектора эпизоотологического мониторинга Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Король Екатерина Васильевна — н.с. лаб. оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8691-1408>

Тетерятникова Наталья Николаевна — н.с. лаб. патогенных буркхольдерий Волгоградского НИПЧИ Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.09.2020;
принята к публикации 02.03.2021;
опубликована 20.05.2021

Ilya D. Kaysarov — researcher, Laboratory of genodiagnosics, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5578-3343>

Ivan M. Shpak — Cand. Sci. (Med.), researcher, Sector of bioinformatics analysis, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Natal'ya V. Boroday — senior researcher, Sector of epizootic monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Ekaterina V. Korol' — researcher, Laboratory of operative diagnostics of bacterial and viral infections, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8691-1408>

Natal'ya N. Teteryatnikova — researcher, Laboratory of pathogenic burkholderia, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 09.09.2020;
accepted for publication 02.03.2021;
published 20.05.2021