Оригинальная исследовательская статья

© Коллектив авторов, 2022 УДК 616.91/93

Check for updates

Обнаружение вируса Западного Нила в зимующих комарах на территории Волгоградской области

Н.В. Бородай, А.В. Несговорова, В.К. Фомина, А.К. Мендыгалиева, А.А. Батурин, А.С. Антонов, Е.Ф. Авдюшева, Е.В. Молчанова, Д.Н. Никитин, Е.В. Путинцева

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ул. Голубинская, д. 7, г. Волгоград, 400131, Российская Федерация

Резюме

Введение. Лихорадка Западного Нила – зоонозная трансмиссивная вирусная инфекция, вызываемая вирусом Западного Нила. Данные о возможности сохранения вируса Западного Нила в межэпизоотический период в регионах с умеренным климатом у зимующих комаров имеют большое значение для понимания механизмов циркуляции патогена. Целью исследования является оценка возможности сохранения вируса Западного Нила в комарах в межэпизоотиче-

ский период в Волгоградской области. Материалы и методы. Объектами исследования являлись зимующие комары, сбор которых проводился в Волгоградской области в 2013–2021 гг. с помощью аккумуляторного аспиратора и ловушки Кришталя. Выявление РНК вируса Западного Нила проводили методом полимеразной депной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Из образца 016/19 (*Сх. ріріеня*, сбор от 02.04.2019 г.), в котором была обнаружена РНК вируса Западного Нила, с использованием культуры клеток VERO был получен изолят (WNV Volgograd_016/19). После этого из отфильтрованного клеточного супернатанта полученного изолята была выделена тотальная РНК. Метагеномное секвенирование образца проводили на высокопроизводительном секвенаторе Illumina MiSEQ.

Результаты. В зимовочных убежищах было собрано 4070 комаров. На наличие РНК вируса Западного Нила исследовано 157 пулов комаров. РНК вируса Западного Нила выявлена в 2 пулах комаров вида *Culex pipiens* и в 1 пуле комплекса *Anopheles maculipennis*. Филогенетический анализ показал, что изолят WNV Volgograd_o16/19, выделенный из пула зимующих комаров, принадлежал ко второму генотипу вируса Западного Нила. Установлена его принадлежность к монофилетической кладе изолятов вируса Западного Нила, выделенных на территории Волгоградской, Астраханской и Ростовской областей в 2007, 2018–2020 годах.

Заключение. В Волгоградской области впервые вирус Западного Нила обнаружен у зимующих комаров. Результаты этих исследований подтверждают гипотезу о персистенции вируса Западного Нила второго генотипа в комарах в течение межэпизоотического периода и возможности передачи вируса Западного Нила от комара к птице в весенний период как один из механизмов формирования местных очагов на эндемичных по лихорадке Западного Нила территориях Российской Федерации без ежегодного заноса вируса.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, вирус Западного Нила, межэпизоотический период, Culex pipiens, комплекс Anopheles maculipennis, зимующие комары.

Для цитирования: Бородай Н.В., Несговорова А.В., Фомина В.К., Мендыгалиева А.К., Батурин А.А., Антонов А.С., Авдюшева Е.Ф., Молчанова Е.В., Никитин Д.Н., Путинцева Е.В. Обнаружение вируса Западного Нила в зимующих комарах на территории Волгоградской области // Здоровье населения и среда обитания. 2022. Т. 30. № 4. С. 70–76. doi: https://doi. org/10.35627/2219-5238/2022-30-4-70-76

Сведения об авторах:

⊠ Бородай Наталья Владимировна – старший научный сотрудник сектора эпизоотологического мониторинга; e-mail: borodai. nat@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2076-5276.

Несговорова Анна Владимировна – научный сотрудник сектора эпизоотологического мониторинга; e-mail: vari2@sprint-v.com. ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5810-8864.

Фомина Валерия Константиновна - научный сотрудник сектора эпизоотологического мониторинга; e-mail: vari2@sprint-v.com. ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6081-4052.

пи, окстр. пиря.//окспельную обособого-монторинга; e-mail: vari2@sprint-v.com. ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3862-9133.

Батурин Артем Александрович – научный сотрудник лаборатории генодиагностики; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9510-7246.

Антонов Александр Сергеевич – научный сотрудник лаборатории биоинформационного анализа; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9342-7211.

ОКСПЭ: https://orcid.org/0000-0001-942-/211.

Авдюшева Елена Федоровна – научный сотрудник лаборатории биоинформационного анализа; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5440-1470.

Молчанова Елена Владимировна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций; e-mail: vari2@ sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3722-8159.

sprint-v.com.ru; OкCID: nttps://orcid.org/0000-502-5159.

Никитин Дмитрий Николаевич – научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и противоэпидемического обеспечения; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6940-0350.

Путинцева Елена Викторовна – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и противоэпидемического обеспечения; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9368-6165.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: Бородай Н.В., Никитин Д.Н.; сбор данных: Несговорова А.В., Фомина В.К., Мендыгалиева А.К., Батурин А.А., Антонов А.С., Авдюшева Е.Ф., Момчанова Е.В.; анализ и интерпретация результатов: Бородай Н.В., Несговорова А.В., Фомина В.К., Мендыгалиева А.К., Момчанова Е.В., Путинцева Е.В.; обзор литературы: Бородай Н.В.; подготовка рукописи: Бородай Н.В., Никитин Д.Н. Все авторы ознакомились с результатами работы и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: дизайн исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Протокол № 2 от 15.06.2020).

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией

Статья получена: 07.10.21 / Принята к публикации: 04.04.22 / Опубликована: 29.04.22

Detection of West Nile Virus in Overwintering Mosquitoes in the Volgograd Region

Natalia V. Borodai, Anna V. Nesgovorova, Valeria K. Fomina, Aina K. Mendygalieva, Artem A. Baturin, Aleksandr S. Antonov, Elena F. Avdiusheva, Elena V. Molchanova, Dmitrii N. Nikitin, Elena V. Putintseva

Volgograd Plague Control Research Institute, 7 Golubinskaya Street, Volgograd, 400131, Russian Federation

Original Research Article

Summarv

Introduction: West Nile fever is a zoonotic, vector-borne viral infection caused by West Nile virus. The possibility of persistence of West Nile virus in overwintering mosquitoes in regions with a temperate climate is of great importance for understanding the mechanisms of pathogen circulation.

Standing the mechanisms of pathogen circulation. Objective: To detect West Nile virus in mosquitoes during the inter-epizootic period in the Volgograd Region. Materials and methods: In 2013–2021, we collected overwintering mosquitoes in different locations of the Volgograd Region using a battery-powered aspirator with a Krishtal's trap to detect West Nile virus RNA in them using a real-time reverse transcription polymerase chain reaction. An isolate (WNV Volgograd_o16/19) was obtained from sample o16/19 (Cx. pipiens, collected on April 2, 2019) with detected West Nile virus RNA using a VERO cell culture. After that, total RNA was isolated from the filtered cell supernatant of that isolate. Metagenomic sequencing of the sample was performed using a high-throughput Illumina MiSeq sequencer, Illumina Inc.

Results: In total, we collected 4,070 mosquitoes in wintering shelters and tested 157 pools of the insects for West Nile virus

Results: In total, we collected 4,070 mosquitoes in wintering shelters and tested 157 pools of the insects for West Nile virus RNA. The latter was detected in two pools of *Culex pipiens* and in one pool of *Anopheles maculipennis* complex. The phylogenetic analysis showed that the WNV Volgograd_o16/19 strain isolated from the pool of wintering mosquitoes belonged to lineage 2 of West Nile virus. We also established its belonging to the monophyletic clade of West Nile virus strains isolated in the Volgograd, Astrakhan, and Rostov regions in the years 2007 and 2018–2020.

Conclusions: We were first to detect West Nile virus in overwintering mosquitoes in the Volgograd Region. Our findings confirm the hypothesis that lineage 2 strains of encephalitic West Nile virus persist in mosquitoes during the inter-epizootic period and can be transmitted from mosquito to bird in springtime as one of the mechanisms of forming autochthonous foci in WNV endemic areas of the Russian Federation in the absence of the annual import of this infection.

Keywords: West Nile fever, West Nile virus, inter-epizootic period, Culex pipiens, Anopheles maculipennis complex, overwintering mosquitoes.

For citation: Borodai NV, Nesgovorova AV, Fomina VK, Mendygalieva AK, Baturin AA, Antonov AS, Avdiusheva EF, Molchanova EV, Nikitin DN, Putintseva EV. Detection of West Nile virus in overwintering mosquitoes in the Volgograd Region. Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya. 2022;30(4):70–76. (In Russ.) doi: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-4-70-76

Author information:

Author information:

Natalia V. Borodai, Senior Researcher, Epizootiological Monitoring Sector, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: borodai.nat@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2076-5276.

Anna V. Nesgovorova, Researcher, Epizootiological Monitoring Sector, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@ sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5810-8864.

Valeria K. Fomina, Researcher, Epizootiological Monitoring Sector, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6081-4052.

Aina K. Mendygalieva, Researcher, Epizootiological Monitoring Sector, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@ sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3862-9133.

Artem A. Baturin, Researcher, Genetic Testing Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9510-7246.

Aleksandr S. Antonov, Researcher, Laboratory of Bioinformatics Analysis, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9510-7246.

sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9342-7211.

Elena F. Avdiusheva, Researcher, Laboratory of Bioinformatics Analysis, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@

Elena F. Avdiusheva, Researcher, Laboratory of Bioinformatics Analysis, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5440-1470.

Elena V. Molchanova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Arbovirus Infections, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3722-8159.

Dmitrii N. Nikitin, Researcher, Laboratory of Epidemiological Analysis and Anti-Epidemic Support, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6940-0350.

Elena V. Putintseva, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Epidemiological Analysis and Anti-Epidemic Support, Volgograd Plague Control Research Institute; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9368-6165.

Author contributions: study conception and design: Borodai N.V., Nikitin D.N.; data collection: Nesgovorova A.V., Fomina V.K., Mendygalieva A.K., Baturin A.A., Antonov A.S., Avdiusheva E.F., Molchanova E.V.; analysis and interpretation of results: Borodai N.V., Nesgovorova A.V., Fomina V.K., Mendygalieva A.K., Molchanova E.V., Putintseva E.V.; literature review: Borodai N.V.; draft manuscript preparation: Borodai N.V., Nikitin D.N. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: The study protocol was approved by the Bioethics Committee of Volgograd Plague Control Research Institute, Minutes No. 2 of June 15, 2020.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article. Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Received: October 7, 2021 / Accepted: April 4, 2022 / Published: April 29, 2022

Введение. Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) зоонозная трансмиссивная вирусная инфекция, вызываемая вирусом Западного Нила (ВЗН). В природе ВЗН поддерживается в энзоотичном цикле между птицами и кровососущими комарами (Diptera, Culicidae). Случайными (тупиковыми) хозяевами могут быть люди, лошади и другие млекопитающие. У человека ЛЗН протекает в виде острого лихорадочного заболевания с симптомами общей интоксикации, умеренного полиаденита, головными и мышечными болями, в ряде случаев с развитием серозного менингита и менингоэнцефалита [1]. На эндемичных по ЛЗН территориях с тропическим и субтропическим климатом циркуляция ВЗН может происходить круглогодично. В регионах с умеренным климатом передача вируса горизонтально позвоночным хозяевам происходит только летом и осенью. В настоящее время ВЗН – наиболее распространенный в Северной Америке и Европе патоген, переносчиками которого являются комары. По данным Референсцентра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила в Российской Федерации, за период 1997-2020 гг. зарегистрировано 2964 случая заболевания лихорадкой Западного Нила в 35 субъектах. Механизмы поддержания ВЗН в межэпизоотический период и распространения инфекции весной на эндемичных территориях мало изучены. Особый интерес для исследователей представляют комары, которые переживают зимний период в состоянии диапаузы в различных убежищах. ВЗН в местных популяциях диапаузирующих Culex pipiens f. pipiens обнаружен в США в Нью-Йорке, Нью-Джерси и Пенсильвании [2-5]. Результаты исследований в долине Сакраменто в Калифорнии показали, что инфицированные самки рода *Culex* могут выживать в течение зимы и, возможно, передавать ВЗН по завершении диапаузы в конце зимы или ранней весной как вертикально, так и горизонтально [6]. В Европе РНК ВЗН у зимующих комаров Cx. pipiens обнаружена в Чехии, в регионе Южная Моравия [7]. На территории Российской Федерации подобных исследований не проводилось. Данные

Оригинальная исследовательская статья

о возможности сохранения ВЗН у зимующих комаров в межэпизоотический период имеют большое значение для понимания циркуляции патогена на эндемичных территориях.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является оценка возможности сохранения вируса Западного Нила в комарах в межэпизоотический период в Волгоградской области. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: проведение скрининга на наличие РНК ВЗН и определение уровня инфицированности зимующих комаров, проведение углубленных молекулярно-генетических исследований генома возбудителя ЛЗН.

Материалы и методы. Сбор комаров проводился в г. Волгограде, Среднеахтубинском и Руднянском районах Волгоградской области в 2013-2021 гг. после осенних заморозков и в феврале - начале апреля (таблица). Диапаузирующих самок комаров собирали со стен и потолков погребов, овощехранилища, омшаника, колодцев с помощью аккумуляторного аспиратора (BioQuip Products) и стеклянной ловушки Кришталя (ООО «Химпром»). Пойманных комаров транспортировали в термоконтейнерах («Термо-Конт МК») с хладоэлементами в лабораторию, обездвиживали в морозильной камере при температуре -20 °C в течение 5-7 минут и определяли до вида по руководству А.В. Гуцевича [8] с помощью стереомикроскопа (Stemi 2000C, Carl Zeiss). Комаров одного вида фасовали на холоде от 2 до 30 особей в микроцентрифужные пробирки (Eppendorf,), которые хранили в морозильной камере при -80 °C. Затем готовили суспензии пулов комаров в физиологическом растворе и проводили выявление РНК вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя. Установление генотипа ВЗН в положительных пробах проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием 3 пар праймеров и 3 зондов (патенты РФ: № 2715625 от 02.03.2020; № 2715617 от 02.03.2020; № 2737396 от 30.11.2020). Комаров вида Сх. pipiens не подвергали анализу с целью выявления различий между внутривидовыми формами: f. pipiens и f. molestus.

Выделение вируса из проб пулов комаров, в которых была обнаружена РНК ВЗН, проводили с использованием культуры клеток Vero. Для этого клетки выращивали в среде DMEM (БиолоТ) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich, USA), 1 % L-глутамина (Gibco) и 1 % антибиотика/антимикотика (Sigma Aldrich) при 37 °С, 5,5 % СО₂ и 70 % влажности. В качестве поддерживающей среды использовалась та же среда с добавлением 2 % эмбриональной бычьей сыворотки. Подготовленный монослой клеточной культуры Vero заражали пробами надосадочной жидкости суспензии комаров согласно классическому протоколу [9].

Для получения углубленной молекулярно-генетической характеристики геноварианта ВЗН, выявленного в зимующих комарах, из отфильтрованного клеточного супернатанта полученного вирусного изолята была выделена тотальная РНК, с которой и проводилась последующая работа по секвенированию. Метагеномное секвенирование образца проводили согласно методике Moser

еt al., 2016 [10], с авторскими изменениями на высокопроизводительном секвенаторе Illumina MiSEQ (Illumina Inc.). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программных продуктов Cutadapt 2.9 [11], Samtools 1.9, Bcftools 1.9, bwa 0.7.17-r1188 [12] и SPAdes v3.11.1 [13], объединенных в конвейеры при помощи собственных скриптов, реализованных на языке Python 3. Для построения множественных выравниваний последовательностей геномов использовали MAFFT v7.271 [14]. Филогенетический анализ осуществляли с помощью программного пакета Mega X [15], для визуализации результатов использовали web-сервис iTOL [16].

Результаты. За период с 2013 по 2021 г. в Волгоградской области в зимовочных убежищах было собрано 4070 комаров: 3602 - Cx. pipiens, 468 — комплекса An. maculipennis. Места сборов, количество особей и результаты исследований на наличие РНК ВЗН зимующих комаров, собранных в Волгоградской области с 2013 по 2021 г., представлены в таблице. На наличие РНК ВЗН исследовано 136 пулов комаров вида Сх. pipiens и 21 пул — комплекса An. maculipennis. С 2013 по 2018 г. и в 2021 г. положительных на наличие РНК ВЗН пулов обнаружено не было. РНК ВЗН выявлена: в 1 пуле комаров вида *Сх. pipiens* и в 1 пуле комплекса An. maculipennis, собранных 02.04.2019 в погребе дачи СНТ «Колос», и 1 пуле комаров Cx. pipiens, собранных 26.02.2020 в погребе усадьбы на хуторе Сахарный. Оба зимовочных убежища расположены на территории Волго-Ахтубинской поймы в Среднеахтубинском районе области.

В результате вирусологического исследования трех проб пулов комаров, в которых была обнаружена РНК ВЗН, удалось получить вирусный изолят из одной (WNV Volgograd_o16/19).

Филогенетический анализ показал, что полученный изолят ВЗН, выделенный из пула зимующих комаров (*Сх. pipiens*, 02.04.2019), принадлежал ко второму генотипу вируса Западного Нила. Установлена его принадлежность к монофилетической кладе геновариантов ВЗН, выделенных на территории Волгоградской, Астраханской и Ростовской областей в 2007, 2018—2020 гг. (рис. 1).

Обсуждение. При исследовании инфицированности возбудителем ЛЗН позвоночных животных и членистоногих в 2013-2021 гг. на территории Волгоградской области РНК ВЗН выявлена в 13 из 914 проб органов диких птиц (1,42 %), в 1 из 1229 проб органов мелких млекопитающих (0,08 %), в 146 из 6820 проб кровососущих комаров (2,14 %) и 7 из 1996 проб иксодовых клещей (0,35 %). При исследовании сывороток крови домашних птиц и лошадей методом ИФА антитела к ВЗН обнаружены в 25 из 49 (51 %) и в 181 из 300 (60 %) исследованных проб соответственно. Эпизоотий ЛЗН среди птиц – основных резервуаров и лошадей — тупиковых хозяев в этот период не зарегистрировано. Основными резервуарами являются врановые и лимнофильные птицы, эффективными переносчиками – комары видов Culex pipiens и Culex modestus. Вероятно, при высокой дозе заражения второстепенными переносчиками могут являться комары видов Aedes vexans, Aedes caspius, Aedes dorsalis, массовый выплод которых происходит в пойменных водоемах в конце мая - июне.

Комары родов Anopheles и Culex зимуют на стадии имаго, и численность диапаузирующих



PH&LE

 $\it Tаблица.$ Места сборов, количество особей и результаты исследований на наличие РНК ВЗН зимующих комаров, собранных в Волгоградской области с 2013 по 2021 г.

Table. Collection sites and the number of overwintering mosquitoes collected and tested for West Nile virus (WNV) RNA in the Volgograd Region in 2013–2021

П/	<u> </u>	TC			I	TC		Пт
Дата сбора / Collection date	Место сбора / Collection site	Координаты I Collection sit	e coordinates	Зимовочное убежище / Overwintering	Вид / Species	Количество особей / Number of	Пулов / Pools	Положитель- ные / Detected
(dd.mm.yyyy)		N	Е	shelter		mosquitoes		WNV positive
09.03.2013	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.607387	44.536846	погреб / cellar	к. An. maculipennis	20	2	0
				•	Cx. pipiens	18	3	0
10.03.2013	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.613909	44.526659	погреб / cellar	Cx. pipiens	41	3	0
20.10.2013	о. Сарпинский /	48.613909	44.526659	погреб / cellar погреб / cellar	к. An. maculipennis Cx. pipiens	140	6	0
17.03.2014	Sarpinsky Island Питомник НИПЧИ / VPCRI nursery	48.715131	44.784519	овощехранили- ще / vegetable warehouse	Cx. pipiens	2	1	0
29.03.2014	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.613909	44.526659	погреб / cellar	Cx. pipiens	67	6	0
27.10.2014	с. Осички / Osichki Village	50.951625	44.499790	омшаник / bee wintering shed	к. An. maculipennis	253	10	0
	Ŭ			колодец / well	Cx. pipiens	12	1	0
04.04.2015	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.613909	44.526659	погреб / cellar	Cx. pipiens	80	4	0
04.04.2015	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.607387	44.536846	погреб / cellar	Cx. pipiens	38	2	0
09.11.2016	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.613909	44.526659	погреб / cellar	Cx. pipiens	484	16	0
20.10.2017	Питомник НИПЧИ / VPCRI nursery	48.715131	44.784519	овощехранили-	Cx. pipiens	100	4	0
				ще / vegetable warehouse	к. An. maculipennis	6	1	0
				овощехранили-	Cx. pipiens	270	9	0
23.10.2018	Питомник НИПЧИ / VPCRI nursery	48.715131	44.784519	ще / vegetable warehouse	к. An. maculipennis	80	3	0
08.11.2018	п. Майский / Maysky Village	48.551588	44.18612	колодец / well	Cx. pipiens	7	1	0
26.03.2019	п. Сакко и Ванцетти / Sacco and Vanzetti Village	48.509927	44.504493	погреб / cellar	Cx. pipiens	10	1	0
28.03.2019	п. Колхозная Ахтуба / Kolkhoznaya Akhtuba Village	48.714760	44.811811	погреб / cellar	Cx. pipiens	6	1	0
02.04.2019	п. Горьковский / Gorkovsky Village	48.689452	44.328706	погреб / cellar	Cx. pipiens	5	1	0
02.04.2019	Дачи Бакалда / Bakalda cottages	48.648770	44.552548	погреб / cellar	Cx. pipiens	370	13	1
				погреб / cellar	к. An. maculipennis	5	1	1
	Dakaida conages	48.651515	44.550491	колодец / well	Cx. pipiens	71	3	0
06.04.2019	o. Сарпинский / Sarpinsky Island	48.613909	44.526659	погреб / cellar	Cx. pipiens	582	20	0
11.11.2019	Питомник НИПЧИ / VPCRI nursery	48.715131	44.784519	овощехранили-	Cx. pipiens	330	11	0
				ще / vegetable warehouse	к. An. maculipennis	30	1	0
11.11.2019	х. Сахарный /	48.683818	44.625473	погреб / cellar	Cx. pipiens	480	13	0
11.11.2017	Sakharny Village	10.005010	11.023713	nor poor contar	к. An. maculipennis	72	2	0
26.02.2020	х. Сахарный / Sakharny Village	48.683818	44.625473	погреб / cellar	Cx. pipiens	180	6	1
12.04.2020	Дачи Бакалда / Bakalda cottages	48.648770	44.552548	погреб / cellar	Cx. pipiens	150	5	0
18.03.2021	х. Сахарный / Sakharny Village	48.683818	44.625473	погреб / cellar	Cx. pipiens	5	1	0
22.03.2021	Дачи Бакалда / Bakalda cottages	48.648770	44.552548	погреб / cellar	Cx. pipiens	154	5	0
ı		ИТОГО	/ TOTAL			4070	157	3

Abbreviation: VPCRI, Volgograd Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Volgograd, Russian Federation.

NC 001563 2 West Nile virus lineage 2 complete genome

Оригинальная исследовательская статья

самок к весне уменьшается более чем на 95 %. Рост популяций комаров этих родов в течение лета происходит постепенно, численность достигает максимума в конце июля — августе, т. е. в сезон передачи ВЗН. Комары рода Anopheles предпочитают питаться на млекопитающих, что ограничивает их роль в передаче ВЗН. Напротив, виды рода Culex, в частности Culex pipiens L. и Culex modestus Fic., распространенные в очагах ЛЗН на юге России, питаются как на птицах, так и на млекопитающих. Кроме того, комары Сх. pipiens и Сх. modestus более восприимчивы к ВЗН и способны к более эффективной передаче вируса, чем комары Aedes vexans, Aedes caspius, Aedes dorsalis. Приведенные данные позволяют считать именно комаров рода Culex основными переносчиками ВЗН на территории России [17]. В Волгоградской области имаго комаров комплекса An. maculipennis, неавтогенной формы Сх. pipiens (f. pipiens) и Cx. modestus зимуют в состоянии диапаузы в естественных и искусственных убежищах (рис. 2). В урбанизированных биотопах это могут быть погреба, колодцы, омшаники, в природных пещеры, норы животных, различные укрытия в прикорневой части деревьев, тростника и т. п.

Поскольку большинство самок, которые входят в состояние диапаузы, не питаются кровью, их инфицирование ВЗН должно происходить посредством вертикальной передачи вируса. Неопровержимым доказательством того, что вертикально инфицированные осенью самки Сх. pipiens f. pipiens, пережившие зиму в состоянии диапаузы, способны следующей весной инициировать заражение, являются результаты исследований, проведенные в 2006 г. Anderson J.F. и Main A.J. [18]. Они описали горизонтальную передачу ВЗН инфицированной по вертикали самкой, находившейся в диапаузе более 5 месяцев, и пришли к выводу, что в умеренном климате передача ВЗН у Cx. pipiens f. pipiens от поколения к поколению является важным средством, позволяющим вирусу сохраняться в зимний период и в последующем вызывать эпизоотии в весенне-летний период. Вероятно редко может также осуществляться и альтернативный механизм, при котором самки перед наступлением диапаузы питаются инфицированной кровью, переживают зиму и передают ВЗН весной [19].

При исследовании 157 пулов комаров, собранных в зимовочных убежищах Волгоградской области в период с 2013 по 2021 г., в 3 пулах обнаружена РНК ВЗН. Общий уровень инфицированности зимующих в Волгоградской области комаров составил 1,9 %. Аналогичный показатель при исследованиях в Нью-Йорке составил 0,1 % [2], в Южной Моравии — 0,5 % [7]. Выявление РНК ВЗН и получение вирусного изолята (WNV Volgograd_o16/19) из зимующих комаров может



Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе выравненных последовательностей геномов ВЗН, кодирующих вирусный полипротеин методом присоединения соседей с бутстрепом = 1000

Fig. 1. A dendrogram built on the basis of aligned West Nile virus genomes' sequences encoding a viral polyprotein by adding neighbors method with bootstrap = 1,000

Original Research Article

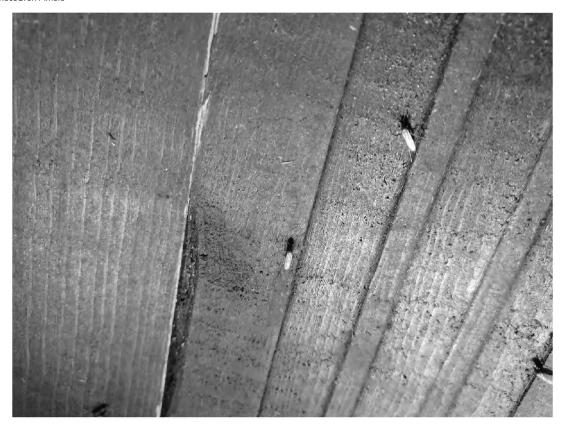


Рис. 2. Диапаузирующие самки *Сх. pipiens* в погребе усадьбы на хуторе Сахарный, Среднеахтубинский район Волгоградской области, 2020 г.

Fig. 2. Diapausing *Culex pipiens* females in the cellar of a homestead in the Sakharny village, Sredneakhtubinsky district of the Volgograd Region, 2020

указывать на возможность длительного сохранения вируса в комарах в межэпизоотический период на эндемичных по ЛЗН территориях Российской Федерации. Типирование ВЗН методом ОТ-ПЦР позволило установить наличие второго генотипа в одном из трех положительных пулов зимующих комаров.

Наши исследования подтверждают предположение о том, что циркуляция ВЗН второго генотипа на эндемичных территориях юга европейской части России поддерживается за счет местной популяции вируса, существующей уже довольно продолжительное время. Так, специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН получены последовательности геномов 11 изолятов ВЗН из образцов полевого и клинического материала в 2019 г. (4 – все из Волгоградской области) и полевого материала в 2020 г. (2 – Астраханская область, 4 — Волгоградская область, 1 — Ростовская область). Филогенетический анализ показал, что все секвенированные изоляты принадлежат ко второму генотипу ВЗН и формируют отдельную кластерную группу, генетически разобщенную со штаммами вируса, выявленными в аналогичный период времени на территориях стран Центральной Европы, Балканского и Средиземноморского регионов. Топология филогенетического дерева указывает на наличие ближайшего единого общего предка у выделенных изолятов ВЗН второго генотипа, существовавшего не позднее 2007 г. Это подтверждают и данные сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей, показавшие у всех изолятов 2018-2020 гг. сходный специфический характер аминокислотных замен, затронувших в основном неструктурные гены. Предположение, что вирусная популяция периодически привносится на данные территории, в настоящее время не находит подтверждения, хотя и не может быть полностью исключено ввиду малого числа исследованных изолятов [20].

Заключение. В Волгоградской области впервые ВЗН обнаружен у зимующих комаров. Результаты этих исследований подтверждают гипотезу о персистенции ВЗН второго генотипа у комаров в течение межэпизоотического периода и возможности передачи ВЗН от комара к птице в весенний период как одного из механизмов формирования местных очагов без ежегодного заноса вируса на эндемичных по ЛЗН территориях Российской Федерации. Однако необходимы дальнейшие исследования резервуаров и переносчиков для углубленного анализа циркуляции ВЗН в Российской Федерации.

Список литературы

- 1. Викторов Д.В., Смелянский В.П., Липницкий А.В. и др. Лихорадка Западного Нила. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт». Волгоград: Волга-Пресс. 2017. 304 с.
- Волгоград: Волга-Пресс, 2017. 304 с.
 2. Nasci RS, Savage HM, White DJ, *et al.* West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(4):742-744. doi: 10.3201/eid0704.010426

Оригинальная исследовательская статья

- 3. Andreadis TG, Armstrong PM, Bajwa WI. Studies on hibernating populations of Culex pipiens from a West Nile virus endemic focus in New York City: parity rates and isolation of West Nile virus. J Am Mosq Control *Assoc.* 2010;26(3):257-264. doi: 10.2987/10-6004.1 4. Farajollahi A, Crans WJ, Bryant P, *et al.* Detection
- of West Nile viral RNA from an overwintering pool of Culex pipiens pipiens (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. J Med Entomol. 2005;42(3):490-494. doi: 10.1093/jmedent/42.3.490
- 5. Bugbee LM, Forte LR. The discovery of West Nile virus in overwintering Culex pipiens (Diptera: Culicidae) mosquitoes in Lehigh County, Pennsylvania. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20(3):326-327.
- Nelms BM, Macedo PA, Kothera L, Savage HM, Reisen WK. Overwintering biology of Culex (Diptera: Culicidae) mosquitoes in the Sacramento Valley of California. J Med Entomol. 2013;50(4):773-790. doi: 10.1603/me12280
- 7. Rudolf I, Betásová L, Blazejová H, et al. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):452. doi: 10.1186/s13071-017-2399-7
- Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары Culicidae. В серии: Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Изд. Наука Ленингр. отд. 1970. Т. III. вып. 4. 384 с.
- Colpitts TM, ed. West Nile Virus: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press; 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-3670-0
- 10. Moser LA, Ramirez-Carvajal L, Puri V, et al. A universal next-generation sequencing protocol to generate noninfectious barcoded cDNA libraries from high-containment RNA viruses. mSystems. 2016;1(3):e00039-15. doi: 10.1128/mSystems.00039-15
- 11. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. journal. 2011;17(1):10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- 12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/ btp352
- 13. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- 14. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30(4):772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- 15. 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):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- 16. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W256-W259. doi: 10.1093/nar/gkz239
- 17. Федорова М.В., Бородай Н.В. О необходимости и путях совершенствования энтомологического мониторинга при эпидемиологическом надзоре за лихорадкой Западного Нила // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017. № 2. C. 37-42. EDN YSTICD
- 18. Anderson JF, Main AJ. Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by Culex pipiens in the Northeastern United States. J Infect Dis. 2006;194(11):1577-1579. doi: 10.1086/508754
- 19. Andreadis TG. The contribution of Culex pipiens complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. J Am Mosq Control Assoc. 2012;28(suppl 4):137-151. doi: 10.2987/8756-971X-28.4s.137
- 20. Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Бородай Н.В. и др. Особенности эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз ее развития в 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 63—72. doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-63-72

References

374uC0

- Viktorov DV, Smelyanskii VP, Lipnitskii AV, et al. [West Nile Virus.] Volgograd: Volga-Press Publ.; 2017. (In Russ.)
- Nasci RS, Savage HM, White DJ, et al. West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000. Emerg Infect Dis. 2001;7(4):742-744. doi: 10.3201/eid0704.010426
- Andreadis TG, Armstrong PM, Bajwa WI. Studies on hibernating populations of Culex pipiens from a West Nile virus endemic focus in New York City: parity rates and isolation of West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc.* 2010;26(3):257-264. doi: 10.2987/10-6004.1
- Farajollahi A, Crans WJ, Bryant P, et al. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of Culex pipiens pipiens (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. J Med Entomol. 2005;42(3):490-494. doi: 10.1093/jmedent/42.3.490
- Bugbee LM, Forte LR. The discovery of West Nile virus in overwintering Culex pipiens (Diptera: Culicidae) mosquitoes in Lehigh County, Pennsylvania. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20(3):326-327
- Nelms BM, Macedo PA, Kothera L, Savage HM, Reisen WK. Overwintering biology of Culex (Diptera: Culicidae) mosquitoes in the Sacramento Valley of California. J Med Entomol. 2013;50(4):773-790. doi: 10.1603/me12280
- Rudolf I, Betasova L, Blazejova H, et al. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):452. doi: 10.1186/s13071-017-2399-7
- Gutsevich AV, Monchadskii AS, Stackelberg AA. [Culicidae Mosquitoes. Fauna of the USSR. Insecta Diptera.] Leningrad: Nauka Publ.; 1970;3(4). (In Russ.)
- Colpitts TM, ed. West Nile Virus: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press; 2016. doi: 10.1007/978--4939-3670-0
- 10. Moser LA, Ramirez-Carvajal L, Puri V, et al. A universal next-generation sequencing protocol to generate noninfectious barcoded cDNA libraries from high-containment RNA viruses. *mSystems*. 2016;1(3):e00039-15. doi: 10.1128/mSystems.00039-15
- 11. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. journal. 2011;17(1):10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- 12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- 13. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- 14. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30(4):772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- 15. 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):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096 16. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4:
- recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W256-W259. doi: 10.1093/nar/gkz239
- 17. Fedorova MV, Borodai NV. On the necessity and ways to improve entomological monitoring in the epidemiological surveillance for West Nile fever. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. 2017;(2):37-42. (In Russ.)
- 18. Anderson JF, Main AJ. Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by Culex pipiens in the Northeastern United States. *J Infect Dis.* 2006;194(11):1577-1579. doi: 10.1086/508754
- 19. Andreadis TG. The contribution of Culex pipiens complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. J Am Mosq Control Assoc. 2012;28(suppl 4):137-151. doi: 10.2987/8756-971X-28.4s.137
- 20. Putintseva EV, Údovichenko SK, Boroday NV, et al. Peculiarities of epidemiological situation on the West Nile fever in the Russian Federation in 2020 and forecast for its development in 2021. Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy. 2021;(1):63-72. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-63-72