

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мельникова О.В.¹, Трушина Ю.Н.¹, Адельшин Р.В.^{1,2}, Андаев Е.И.¹, Леонова Г.Н.³

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск, Россия;

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, 664003, Иркутск, Россия;

³ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, 690087, Владивосток, Россия

Клещевой энцефалит – трансмиссивная вирусная инфекция, широко распространенная в умеренном поясе Евразии. Для выявления инфицированности переносчиков вирусом КЭ используют ИФА и ПЦР, результаты которых часто не совпадают. Цель работы – сравнительный анализ зараженности ВКЭ природных популяций иксодовых клещей при комплексных исследованиях с помощью ИФА, ПЦР и метода изоляции вируса на модели лабораторных мышей. В период 2013-2019 гг. в природных очагах клещевого энцефалита Прибайкалья собрано 18608 экз. иксодовых клещей. Суспензии клещей исследовали индивидуально с помощью ИФА (n=17610) и ПЦР (n=2999), а положительными по результатам этих тестов пробами заражали мышей 2-3-суточного возраста. Доля клещей с антигеном ВКЭ в среднем составила 1,2 %. Все клещи, показавшие в ИФА положительный результат, были исследованы в ПЦР (группа 1). Часть проб с отрицательными результатами в ИФА также исследовали с помощью ПЦР (группа 2). В группе 1 генетический материал в ПЦР выявлен в 68,9±3,13 % суспензий, средний показатель Ct составил 24,6±0,38. Во второй группе положительные результаты в ПЦР составили 2,7±0,31 %. Средний показатель Ct = 31,0±0,70. Разница средних величин Ct между группами 1 и 2 статистически достоверна (p < 0,001; df = 118). В пробах группы 1 процент изоляции штаммов ВКЭ был значительно выше (21,7±2,77 %), чем в группе 2 (8,2±5,26 %; p < 0,05; df = 50). При исследовании больших выборок клещей рационально использовать ИФА. Для получения более полного представления о доле в природных очагах КЭ переносчиков, представляющих эпидемическую опасность, предлагается суммировать результаты двух экспресс-методов. Изоляцию вируса целесообразно проводить из суспензий, одновременно показавших положительный результат как в ИФА, так и в ПЦР.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ); иксодовые клещи; вирусофорность; иммуноферментный анализ (ИФА); полимеразная цепная реакция (ПЦР); изоляция вируса.

Для цитирования: Мельникова О.В., Трушина Ю.Н., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Леонова Г.Н. Анализ эффективности методов детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(4): 237-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-237-241>

Mel'nikova O.V.¹, Trushina Yu.N.¹, Adel'shin R.V.^{1,2}, Andaev E.I.¹, Leonova G.N.³

ANALYSIS OF EFFECTIVITY OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS DETECTION METHODS IN IXODID TICKS

¹Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Siberia and the Far East, 664047, Irkutsk, Russia;

²Irkutsk State University, 664003, Irkutsk, Russia;

³Scientific-Research Institute of epidemiology and microbiology named after G.P. Somov, 690087, Vladivostok, Russia

Tick-borne encephalitis (TBE) is transmissible viral disease widely common in temperate zone of Eurasia. ELISA and PCR are used for express identification of the vector's infection, but the results of the two methods often do not agree. Aim of the work is comparative analysis for TBE virus of Ixodid ticks from nature using complex of methods, including ELISA, PCR, and isolation of the virus in laboratory mice. 18608 Ixodid ticks were collected during 2013-2019 in TBE natural foci of the Baikal Region. The ticks suspensions were examined individually, using ELISA (n=17610) and PCR (n=2999). Suckling mice were inoculated with the suspensions positive in the both tests. The TBEV antigen was found in 1.2 % of ticks in average. All ticks positive in ELISA were examined in PCR (Group 1). Randomly selected part of negative-ELISA samples were examined in PCR too (Group 2). The PCR results were positive in 68.9±3.13 % of the Group 1, with average Ct index 24.6±0.38. Positive results of PCR in Group 2 accounted for just 2.7±0.31 % with average Ct index 31.0±0.70. The average Ct margin of the Groups 1 and 2 is statistically significant (p < 0.001; df = 118). Isolation of strains was significantly more successful in Group 1 (21.7±2.77 %), than in Group 2 (8.2±5.26 %; p < 0.05; df = 50). ELISA is more useful for examining large amounts of ticks. To get a more complex picture about epidemically dangerous part of the vectors in TBE natural foci, the results of the two express-methods is better to sum. The isolation of the virus is useful to carry out of the samples positive in ELISA and PCR concurrently.

Key words: tick-borne encephalitis virus (TBEV); Ixodid ticks; density of infected ticks; ELISA; PCR; virus isolation.

For citation: Mel'nikova O.V., Trushina Yu.N., Adel'shin R.V., Andaev E.I., Leonova G.N. Analysis of effectivity of the tick-borne encephalitis virus detection methods in ixodid ticks. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66(4): 237-241 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-237-241>

For correspondence: Melnikova O.V., Sc. D., senior researcher; e-mail: melnikovaovit@gmail.com

Information about authors:

Mel'nikova O.V. , <https://orcid.org/0000-0001-5133-0323>
Trushina Yu.N. , <https://orcid.org/0000-0003-4501-146X>
Adel'shin R.V. , <https://orcid.org/0000-0003-3690-3992>
Andaev E.I. , <https://orcid.org/0000-0002-6612-479X>
Leonova G.N. , <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 05.06.2020
Accepted 20.10.2020

Введение. Клещевой энцефалит (КЭ) широко распространен на территории умеренного пояса Евразийского континента. Для понимания эпидемиологии этой инфекции и стратегии иммунопрофилактики необходимы знания об участии иксодовых клещей в обеспечении циркуляции вирусных популяций в природных очагах КЭ. Важными факторами, определяющими напряженность очагов КЭ, являются не только численность переносчиков вируса, но и доля зараженных особей или, как определяют Ю.С. Коротков и соавт. [1], численность векторной популяции переносчика. В настоящее время для исследования природного и клинического материала используют несколько способов детекции вируса КЭ (ВКЭ) (биологические, серологические, молекулярно-генетические), которые имеют свои достоинства и недостатки [2]. Выбор способов зависит от задач исследований, от финансовых и технических возможностей каждой лаборатории, имеющей определенный уровень биобезопасности. В специализированных лабораториях, где применяются одновременно разные диагностические подходы, было замечено: результаты применяемых методов исследований часто не совпадают. Это обстоятельство неоднократно привлекало внимание исследователей, которые, как правило, стремились показать преимущество и эффективность предлагаемого метода [3, 4]. Но даже в случае применения одного и того же метода исследования возможны несовпадения полученных результатов. Такое может происходить при использовании тест-систем разных производителей [2, 5], при нарушении протокола проведения анализа [6], неоднозначности трактовки результатов [7] и некоторых технических ошибок при постановке реакции [8]. На основе экспериментальных исследований Г.Н. Леоновой [9] были показаны особенности верификации ВКЭ. Предложенные автором рекомендации предстояло использовать для изучения вирусофорности иксодовых клещей, обитающих в природных очагах инфекции.

Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ зараженности вирусом КЭ иксодовых клещей из природных популяций Прибайкалья при комплексных исследованиях, используя иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и метод изоляции вируса на модели лабораторных мышей.

Материал и методы. В весенне-летние периоды 2013 – 2019 гг. были проведены сборы иксодовых клещей (97,7 % из которых – имаго *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930) на флаг в природных очагах КЭ Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия). За этот период собрано 18608 экз. иксодовых клещей, которые были исследованы индивидуально. Для подготовки суспензии использовали физиологический раствор (0,5 мл на одного клеща) с антибиотиками (пенициллин 500 ед/мл). Всех собранных клещей первоначально исследовали

с помощью ИФА (Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса клещевого энцефалита («Микроген», Томск-Москва)) в соответствии с инструкцией производителя. Учет результатов проводили с помощью иммуноферментного анализатора IMARK BioRAD при длине волны 450 нм. Пробу считали положительной, если отношение величины ее экстинкции к величине экстинкции нормального контроля (P/N) было 2,1 и более.

Кроме скрининга с помощью ИФА, проводили выборочное исследование клещей в ОТ-ПЦР-РВ (метод случайных выборок; $n=2999$), используя набор реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferis.l.*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris-FL*» ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). РНК вируса выделяли с помощью набора «Ампли-Прайм® РИБО-преп» ООО «НекстБио» (Москва). Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Результаты учитывали на термоциклере C1000™ Bio-Rad CFX96™ (США) по значению величины порогового цикла Ct (граничное значение равно 38).

В последующем суспензиями клещей, положительными по результатам ИФА и ПЦР, заражали внутримозговым способом лабораторных мышей 2-3-суточного возраста по общепринятой методике. За животными наблюдали 21 день. У заболевших мышей забирали головной мозг, руководствуясь «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Минздравсоцразвития Российской Федерации № 708н от 23.08.2010). При отсутствии клинических признаков заболевания, на 7-е сутки после заражения проводили «слепой» пассаж.

Материалы по заболеваемости КЭ жителей г. Иркутска взяты из авторской Базы данных¹.

Статистическая обработка данных проводилась стандартными методами (оценка среднего, стандартное отклонение, критерий Стьюдента, корреляционный анализ) с помощью программного продукта Microsoft Excel-2007.

Результаты. С помощью разных методов детекции ВКЭ в иксодовых клещах природных очагов Прибайкалья получены данные многолетних показателей вирусофорности переносчика. Результаты исследования клещей экспресс-методами представлены в табл. 1. С помощью ИФА исследовано 17 610 суспензий клещей, антиген ВКЭ обнаружен в 219 пробах, что составило $1,2 \pm 0,08$ %. Все клещи, показавшие в ИФА положительный результат,

¹Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620219 от 31.01.13 г.

были исследованы с помощью ПЦР (группа 1). Кроме того, часть суспензий с отрицательными результатами в ИФА исследовали с помощью ПЦР (группа 2).

Из 219 исследованных проб группы 1 положительные результаты ПЦР в разные годы выявляли от 40,5 до 100 %, средний показатель был равен $68,9 \pm 3,13$ %. Значения Ct этих проб колебались от 19 до 30, средний показатель составил $24,6 \pm 0,38$. Корреляция показателей зараженности клещей в ИФА и ПЦР не выявлена ($r_s = -0,028$).

Во второй группе исследовано 2780 проб клещей, в 75 случаях получены положительные результаты в ПЦР, что составило $2,7 \pm 0,31$ %. Значения Ct колебались от 21 до 36, средний показатель достигал $31,0 \pm 0,70$, что свидетельствует о низкой концентрации РНК ВКЭ в этих пробах. Разница средних величин Ct между группами 1 и 2 статистически достоверна ($p < 0,001$; $df = 118$).

Если результаты ПЦР обследованных клещей группы 1 явились фактом подтверждения их инфицированности, обнаруженной с помощью ИФА, то результаты ПЦР группы 2 свидетельствовали о том, что в исследованных пробах происходил не полный учет инфицированности их ВКЭ. В этой связи все случаи детекции генетического материала ВКЭ в клещах 2-й группы мы добавили к числу положительных результатов, выявленных в ИФА, и в итоге получили более полную картину вирусофорности переносчика.

В табл. 2 показаны уточненные данные по вирусофорности иксодовых клещей, а также по заболеваемости КЭ

жителей г. Иркутска, заражавшихся на обследованных территориях Прибайкалья в течение изучаемого периода.

Примечательно, что показатели заболеваемости не коррелировали с показателями зараженности клещей как по результатам ИФА ($r_s = -0,046$), так и по данным суммарной вирусофорности ($r_s = -0,036$), указывая на то, что даже уточненной информации о доле зараженных клещей недостаточно для выявления взаимосвязи сложных механизмов, влияющих непосредственно на заболеваемость КЭ.

Инфекционность вируса в этих пробах показана на модели мышей 2-3-суточного возраста. Так, в пробах группы 1 процент изоляции штаммов ВКЭ был значительно выше ($21,7 \pm 2,77$ %), чем в группе 2 ($8,2 \pm 5,26$ %; $P < 0,05$; $df = 50$).

Обсуждение. В настоящее время практически в каждом регионе Российской Федерации, эндемичном по КЭ, проводятся исследования иксодовых клещей на выявление маркеров ВКЭ с помощью ИФА и ПЦР. На основании нашего анализа корреляция результатов экспресс-методов как между собой ($r_s = 0,006$), так и с показателями заболеваемости отсутствует.

Следует отметить, что результаты исследования переносчиков даже одним и тем же методом на разных территориях трудно сопоставлять. Особенно это касается использования альтернативных методов (ИФА и ПЦР), результаты которых расходятся у некоторых авторов до

Таблица 1

Результаты выявления маркеров вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах из природных очагов Прибайкалья

Годы	Результаты ИФА		Результаты ПЦР			
			Группа 1 (ИФА+)		Группа 2 (ИФА-)	
	n / из них положительные	%±m	n / из них положительные	%±m	n / из них положительные	%±m
2013	2160/31	1,4±0,26	31/31	100,0±2,94	253/9	3,6±1,16
2014	2216/22	1,3±0,26	22/22	100,0±4,00	479/9	1,9±0,62
2015	2336/43	1,8±0,28	43/31	72,1±6,84	325/10	3,1±0,96
2016	2774/19	0,7±0,16	19/16	84,2±8,37	298/5	1,7±0,74
2017	2551/48	1,9±0,27	48/21	43,8±7,16	427/16	3,7±0,92
2018	2495/42	1,7±0,26	42/17	40,5±7,57	430/5	1,2±0,52
2019	3078/14	0,5±0,12	14/13	92,9±6,88	568/21	3,7±0,79
Всего	17610/219	1,2±0,08	219/151	68,9±3,13	2780/75	2,7±0,31

Таблица 2

Суммарные показатели зараженности вирусом КЭ иксодовых клещей, собранных с растительности в природных очагах, и заболеваемость КЭ в Прибайкалье

Годы	Исследовано клещей в ИФА и ПЦР	Суммарное количество проб, положительных в ИФА+ и ПЦР+	Вирусофорность иксодовых клещей (%±m)	Заболеваемость КЭ (на 100 тыс. населения)
2013	2160	40	1,9±0,29	6,2
2014	2216	33	1,5±0,26	4,2
2015	2336	53	2,3±0,31	6,2
2016	2774	24	0,9±0,18	5,7
2017	2551	64	2,5±0,31	3,3
2018	2925	47	1,6±0,23	4
2019	3646	35	1,0±0,16	4
Всего	18608	296	1,6±0,09	4,8

40 % [10]. По нашему мнению, основанному на результатах многолетней работы по мониторингованию ситуации в природных очагах и проведению скрининга зараженности иксодовых клещей из объектов окружающей среды, методом выбора в первую очередь служит ИФА. Его безусловными преимуществами являются значительно меньшая трудозатратность и стоимость по сравнению с ПЦР, а также высокая пропускная способность. Несмотря на меньшую чувствительность ИФА по сравнению с ПЦР [4, 9], этот метод, по нашему мнению, достаточно специфичен для индикации вируса в переносчиках. Известно, что возникновение случаев заболевания у людей может происходить после присасывания клещей, содержащих высокую дозу вируса (более 3 lg КИД₅₀) [11, 12]. В экспериментальных работах со штаммами ВКЭ разной патогенности показано, что положительные результаты в ИФА и ПЦР можно выявлять при титре вируса не менее чем 1-1,5 log TCID₅₀, т.е. этот уровень вируса в пробах определен, как эпидемически значимый [9].

Еще одним аргументом в пользу применения ИФА для выявления инфицированных клещей является возможность обнаружения с его помощью других вирусов комплекса КЭ [6, 13]. С одной стороны, это может свидетельствовать о невысоком уровне специфичности ИФА, но с другой стороны расширяется спектр выявляемых антигенно-близких возбудителей, которые циркулируют в природных очагах одновременно с ВКЭ (Омская геморрагическая лихорадка в Западной Сибири или вирус Повассан в Приморском крае).

Следует уточнить, что детекция генетического материала возбудителя в ПЦР не гарантирует выявление инфекционного вируса ни в природных образцах, ни в пробах от людей [2, 15]. Об этом свидетельствуют и результаты, полученные в настоящей работе: в группе 1 (ИФА+) генетический материал ВКЭ выявлен у 68,9 % клещей, а инфекционными для мышей оказались 21,7 % от этих проб; во второй группе (ИФА-) эти показатели были значительно ниже (2,7 и 8,2 % соответственно).

До сих пор изоляция возбудителя на биологической модели считается «золотым стандартом», подтверждающим присутствие жизнеспособного вируса в исследуемой пробе [2]. В работах, касающихся детекции ВКЭ, показан разный уровень соответствия результатов экспресс-методов и биопробы: ИФА vs биопроба – 67,6 % (исследование пулов клещей), МГНК vs биопроба – 66,4 % [3]; 35,0-80,6% апатогенных образцов оказалось среди вирусифорных клещей по данным комплекса методов (ИФА и ПЦР) [14]. В той же работе отмечены отрицательные результаты ОТ-ПЦР и ИФА для клещевых суспензий, вызывающих заболевание КЭ у мышей. А.М. Титенко и соавт. [16] из суспензий клещей, положительных в ИФА, ВКЭ выделяли в 41,2 % случаев, а отрицательных – в 6,8 %.

Следует отметить, что как в нашем исследовании, так и в работах других авторов показатели вирусифорности переносчиков ВКЭ в природных очагах не коррелировали с уровнем заболеваемости населения на соответствующих территориях [17, 18]. По мнению Э.И. Коренберга и соавт. [19] процент зараженности клещей возбудителем плохо отражает эпизоотическое состояние очага, поскольку этот показатель не позволяет судить о количестве возбудителя в инфицированных особях. В настоящем исследовании клещей группы 2 в ПЦР высокий показатель средней величины порогового цикла (Ct = 31) также свидетельствовал о небольшом количестве

вирусной РНК в исследуемых образцах, что объясняло редкие случаи изоляции ВКЭ в этой группе проб.

Таким образом, анализ многолетних исследований по индикации ВКЭ в клещах из природных очагов с помощью двух экспресс-методов ИФА и ПЦР и по изоляции вируса на биологической модели, позволили сделать следующие выводы:

1. С целью проведения мониторинга вирусифорности иксодовых клещей для анализа больших выборок членистоногих из природных очагов рационально использовать ИФА, который позволит получить предварительное представление о доле эпидемически значимых переносчиков ВКЭ.

2. Для оценки полной картины вирусифорности иксодовых клещей следует одновременно проводить исследование в ИФА и в ПЦР, суммируя результаты в общий показатель зараженности клещей ВКЭ.

3. Для эффективной изоляции штаммов вируса КЭ из суспензий исследуемых клещей биопробу следует проводить в случаях одновременного выявления АГ в ИФА и генетического материала в ПЦР.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, принимавших в разные годы участие в сборе клещей и пробоподготовке.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5, 18 см. REFERENCES)

1. Коротков Ю.С., Буренкова Л.А., Рукавишников М.Ю. Вирусифорность голдных взрослых клещей *Ixodes persulcatus* в среднетаежных лесах Карелии (северо-запад Прионежья). Медицинская вирусология. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова. 2006; XXIII: 90-4.
3. Злобин В.И., Кветкова Э.А., Наволокин О.А., Мансуров П.Г., Дрокин Д.А., Пищенко Н.Д. и др. Сравнение трёх экспресс-методов индикации вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 1990; 1: 57-9.
4. Белова О.А., Буренкова Л.А., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Топычанова Н.Г., Кувшинова И.Н. и др. Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Вопросы вирусологии.* 2014; 59 (5): 38-43.
6. Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузова О.В., Орлова О.Е., Романова Л.Ю., Гмыль А.П. и др. Проблемы идентификации вируса клещевого энцефалита в клещах. Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Покровский В.И., ред. М.: ООО «Издательство МБА», 2014а; 1: 505.
7. Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузова О.В., Гмыль А.П., Романова Л.Ю., Бойко В.А. и др. Оценка зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита с использованием различных методов исследования. Неоднозначность трактовки результатов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; 3 (76): 29-35.
8. Масыго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА (информационно-методическое пособие). Кольцово; 2004.
9. Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64 (11): 686-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>.
10. Ржанова Т.Г., Дубинина О.А., Лютая Н.И. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита на территории Тюменской области. Актуальные проблемы

- природной очаговости болезней. Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней (24-25.11.09, г. Омск). Рудаков Н.В., Ястребов В.К., ред. Омск: ИЦ «Омский научный вестник»; 2009: 55-6.
11. Пеньевская Н.А. Методологические подходы к оценке эффективности этиотропной противовирусной иммунопрофилактики (на примере препаратов иммуноглобулина против клещевого энцефалита). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008; 10 (1): 70-84.
 12. Пеньевская Н.А., Злобин В.И. Экстренная профилактика клещевого энцефалита с помощью гомологичного специфического иммуноглобулина: теория и практика. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 70 (3): 81-9.
 13. Наволокин О.В., Субботина Л.С., Хотетитский В.Я. Использование прямого иммуноферментного метода для идентификации и индикации вируса клещевого энцефалита. *Природно-очаговые болезни человека*. Омск; 1985: 45-50.
 14. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Романенко В.Н., Панов В.В. Ограничения молекулярных методов при анализе природных популяций РНК-содержащих вирусов. *Молекулярная диагностика*. Сборник трудов. Покровский В.И., ред. М.: ООО «Издательство МБА», 2014; 1: 512-3.
 15. Леонова Г.Н. Верификация случаев лихорадки Денге, завезенных на территорию юга Дальнего Востока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (6): 382-386. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-382-386>.
 16. Титенко А.М., Бахум С.В., Андаев Е.И., Борисова Т.И. Эффективность альтернативных методов изоляции вируса клещевого энцефалита из клещей *Ixodes persulcatus*. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 1 (2): 162-5.
 17. Валицкая А.В., Рязанцева Г.А., Катин А.А., Пустовалова В.Я. Сравнительная характеристика риска заражения клещевым энцефалитом в очагах с различной ландшафтной приуроченностью. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2002; 4: 11-4.
 19. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Гинзбург А.Л., Злобин В.Н., ред. М., 2013.
-
- REFERENCES
1. Korotkov Yu.S., Burenkova L.A., Rukavishnikov M.Yu. Density of infected questing imago ticks *Ixodes persulcatus* in Karelian middle-taiga forests (northwestern Prionezhie). *Meditinskaya virusologiya* [Trudy Instituta poliomielitov I virusnykh entsefalitov im. M.P. Chumakova]. 2006; XXIII: 90-4. (in Russian)
 2. Ergunay K., Tkachev S., Kozlova I., Růžek D. A Review of Methods for Detecting Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Tick, Animal, and Human Specimens. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16 (1): 4-12. doi: 10.1089/vbz.2015.1896. DOI: 10.1089/vbz.2015.1896.
 3. Zlobin V.I., Kvetkova E.A., Navolokin O.A., Mansurov P.G., Drokin D.A., Pitsenko N.D. et al. Comparison of three express methods of the tick-borne encephalitis virus indication. *Voprosy virusologii*. 1990; 1: 57-9. (in Russian)
 4. Belova O.A., Burenkova L.A., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Topychkanova N.G., Kuvshinova I.N. et al. The effectivity of tick-borne encephalitis virus detection in Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) using ELISA and real-time polymerase chain reaction. *Voprosy virusologii*. 2014; 59 (5): 38-43. (in Russian)
 5. Ackermann-Gäumann R., Eyer C., Leib S.L., Niederhauser C. Comparison of Four Commercial IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibodies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2018; 19 (5): 358-64. doi: 10.1089/vbz.2018.2359.
 6. Kholodilov I.S., Belova O.A., Motuzova O.V., Orlova O.E., Romanova L.Yu., Gmyl' A.P. et al. The problems of tick-borne encephalitis virus identification in ticks. In: *Molecular diagnostics: Proceedings of the Conference*. Pokrovsky V.I., ed. Moscow: OOO "Izdatel'stvo MBA", 2014a; 1: 505. (in Russian)
 7. Kholodilov I.S., Belova O.A., Motuzova O.V., Gmyl' A.P., Romanova L.Yu., Boyko V.A. et al. Evaluation of tick-borne encephalitis virus infection of the ticks using various research methods. The ambiguity of the results interpretation. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2014b; 3 (76): 29-35. (in Russian)
 8. Masyago A.V. Some errors in ELISA setting (informational and methodical material). Koltsovo; 2004. (in Russian)
 9. Leonova G.N. The comparative analysis of the tick-borne encephalitis virus verification methods. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (11): 686-9. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>. (in Russian)
 10. Rzhanova T.G., Dubinina O.A., Lyutaya N.I. Epidemiological features of tick-borne encephalitis in Tyumen region. In: *Actual problems of natural-focal diseases: Proceedings of the All-Russian Conference with International participation*. Омск, 2009: 55-6. (in Russian)
 11. Pen'evskaya N.A. Methodological approaches applied to the assessment of aetiotropic antiviral immunoprophylaxis (by examining of anti-tick-borne encephalitis immunoglobulin drugs). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2008; 10 (1): 70-84. (in Russian)
 12. Pen'evskaya N.A., Zlobin V.I. Urgent prevention of tick-borne encephalitis by using homological specific immunoglobulin: theory and practice. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2013; 70 (3): 81-9. (in Russian)
 13. Navolokin O.V., Subbotina L.S., Khotetitskiy V.Ya. Using of direct ELISA for indication and identification of tick-borne encephalitis virus. *Prirodnoochagovye bolezni cheloveka*. Омск; 1985: 45-50. (in Russian)
 14. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Romanenko V.N., Panov V.V. Constrains of molecular methods in assessing of natural RNA viruses populations. *Molekulyarnaya diagnostika*. Proceedings of the Conference. Pokrovsky V.I. ed. Moscow: OOO "Izdatel'stvo MBA", 2014; 1: 512-3. (in Russian)
 15. Leonova G.N. Verification of dengue fever cases, imported in the territory of southern Far East. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2020; 65(6): 382-6. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-382-386>. (in Russian)
 16. Titenko A.M., Bakhum S.V., Andaev E.I., Borisova T.I. Effectivity of alternative methods of the tick-borne encephalitis virus isolation from the *Ixodes persulcatus* ticks. *Byulleten' VSNITs SO RAMN*. 2004; 1 (Tom 2): 162-5. (in Russian)
 17. Valitskaya A.V., Ryazantseva G.A., Katin A.A., Pustovalova V.Ya. Tick-borne encephalitis relative exposure risk in natural foci with different landscape locating. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2002; 4: 11-4. (in Russian)
 18. Moshkin M.P., Novikov E.A., Tkachev S.E., Vlasov V.V. Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health. *Bioessays*. 2009; 31 (6): 620-8.
 19. Korenberg E., Pomelova V., Osin N. Infections with natural focality transmitted by Ixodid ticks [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshcheyami]. Ginzburg A.L., Zlobin V.N., eds. Moscow; 2013. (in Russian)