

ХАСНАТИНОВ

Максим Анатольевич

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО
ЭНЦЕФАЛИТА И ДРУГИХ КЛЕЩЕВЫХ ПАТОГЕНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ
УСТОЙЧИВОГО СУЩЕСТВОВАНИЯ ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ В ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ И
МОНГОЛИИ**

03.02.02 – вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Кольцово 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ).

Научный консультант: Данчинова Галина Анатольевна,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ

Официальные оппоненты:

1

2

3

Ведущая организация:

Защита состоится « ____ » _____ 20__ г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

К настоящему времени в России регистрируется 5 основных трансмиссивных клещевых инфекций – клещевой энцефалит (КЭ), болезнь Лайма или клещевой боррелиоз (КБ), клещевой риккетсиоз (КР), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) (Alekseev A.N. et al., 2001; Афанасьева М.В. и др., 2006; Шпынов С.Н., 2006; Усков Ю.В. и др., 2010; Rag V.A., 2010; Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013 и др.). Доступные в настоящее время средства борьбы с клещевыми инфекциями включают вакцинацию, иммуноглобулинотерапию и иммунопрофилактику КЭ (Злобин В.И. и Горин О.З., 1996; Kunz С., 2003; Korenberg E.I., 2004; Козлова И.В. и др., 2007, и др.), антибиотикотерапию и антибиотикопрофилактику бактериальных клещевых инфекций (Лобзин Ю.В., 2000; Nadelman R.W., 2001; Манзенюк И.М., 2005). Меры неспецифической профилактики главным образом включают индивидуальную защиту человека от укусов клещей и уничтожение клещей-переносчиков инфекций в природе (Лобзин Ю.В., 2000; Шашина Н.И., 2012; Коренберг Э.И., 2013).

Тем не менее, заболеваемость клещевыми инфекциями остается на стабильно высоком уровне в течение последних 15 лет. Так, например, в Иркутской области заболеваемость КЭ составляет 4-5 случаев на 100 тыс. населения в год и превышает общероссийские показатели в 3-4 раза (Государственный доклад..., 2017). Многие авторы указывают на серьезные недостатки существующих мер специфической (Романенко В.В., 2007; Heinz F.X., 2007; Mantke O.D., 2008 и др.) и неспецифической (Uspensky I., 1999; Салдан И.П., 2000; Огурцов А.А., 2005; Амосов А.Д., 2006; Девятков М.Ю., 2006; Brei B., 2009; Klafke G.M., 2010; Норе М, 2010; Коренберг Э.И., 2013 и др.) профилактики клещевых инфекций и отмечают необходимость разработки новых способов их контроля.

Интенсивные исследования возбудителя КЭ – вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) - на протяжении последних 80 лет позволили установить две фундаментальных черты. Во-первых, в природе вирус существует в форме относительно независимых популяций бесконечно циркулирующих между беспозвоночными и позвоночными хозяевами при помощи процесса горизонтальной и вертикальной трансмиссии. Во-вторых, было выявлено существенное внутривидовое генетическое разнообразие ВКЭ, которое увеличивается по мере нарастания объемов исследованных штаммов. Так, к настоящему моменту описано три субтипа вируса, при этом внутри каждого субтипа выделяются 3-4 эволюционно независимые группы (Ecker 1999; Hayasaka D., 2001; Gritsun T.S., 2003; Kovalev S.Y., 2009 и др.). Позднее выяснилось, что подобная ситуация характерна и для *Borrelia burgdorferi sensu lato* и других клещевых

патогенов (Алексеев А.Н., 1993; Dykhuizen D.E., 1993; Postic D., 1994; Gritsun T.S., 2003; Masuzawa T., 2004; Шпынов С. Н., 2004; Фадеева И.А., 2005; Нефедова В.В., 2008; Tilly K., 2008; Thomas R.J., 2009; Рудаков Н.В., 2012 и др.). Тем не менее, целый ряд вопросов, связывающих циркуляцию ВКЭ в природе, и генетическое разнообразие вируса остаются недостаточно исследованными. Какими естественными причинами обусловлено формирование разнообразия ВКЭ? Какую роль это разнообразие играет в устойчивой циркуляции вируса в природе? Есть ли какие-то уязвимые элементы в трансмиссионном цикле ВКЭ? Ответы на эти вопросы, возможно, раскроют новые свойства трансмиссивных инфекций и позволят усовершенствовать способы контроля КЭ. В целом это справедливо и для других клещевых патогенов.

Таким образом, как современная эпидемическая ситуация, так и накопленный к настоящему времени объем научных данных, обуславливают актуальность дальнейшего исследования фундаментальных механизмов существования ВКЭ и других клещевых патогенов в природе и разработки новых способов контроля этих инфекций.

Степень разработанности темы исследования

Высокая актуальность клещевых инфекций обуславливает довольно глубокую разработанность темы, как в России, так и за рубежом. Интенсивно ведутся работы по описанию и анализу генетического разнообразия молекулярной биологии вируса клещевого энцефалита. Внутри вида ВКЭ выделяют, по меньшей мере, 3 субтипа, ассоциированных с определенным географическим ареалом (Ecker M., 1999; Gaunt M.W., 2001; Gritsun T.S., 2003; Злобин В.И., 2007; Dai X., 2018 и др.), причем внутри каждого субтипа описано 2-5 эволюционных линий (Локтев В.Б., 2007; Golovljova I., 2008; Kovalev S.Y., 2009; Козлова И.В., 2012; Fajs L., 2012; Tkachev S.E., 2017 и др.). Показано, что каждый из описанных генетических вариантов ВКЭ и бактериальных инфекций способен инфицировать широкий спектр позвоночных и беспозвоночных хозяев (Злобин В.И., 1996; Вотяков В.И., 2002; Бахвалова В.Н., 2007; Donoso-Mantke O., 2011; Кнар N., 2012; Коренберг Э.И., 2013; Москвитина Н.С., 2014; Мельникова О.В., 2017). Аналогичные исследования проводятся в отношении *B. burgdorferi sensu lato*, *Rickettsia sp.*, и других бактериальных клещевых инфекций (Dumler J.S., 2001; Hanincová K., 2003; Masuzawa T., 2004; Фадеева И.А., 2005; Kawahara M., 2006; Margos G., 2009, 2011; Нефедова В.В., 2010; Rar V.A., 2010; Коренберг Э.И., 2013; Ivanova L.B., 2014; Рудаков Н.В., 2015; Igoikina Y., 2018 и др.). При этом биологический и экологический смысл наблюдаемого генетического разнообразия ВКЭ и бактериальных инфекций остается малоизученным. Неизвестны экологические причины и молекулярные механизмы формирования внутривидовых групп. Непонятно, за счет каких естественных барьеров

поддерживается внутривидовое разнообразие ВКЭ, а также *B. burgdorferi sensu lato* и других клещевых бактерий в условиях общности позвоночных и беспозвоночных хозяев и симпатрии.

Цель исследования

Оценка роли генетического разнообразия в формировании стабильных популяций патогенных для человека микроорганизмов, экологически связанных с иксодовыми клещами в экосистемах Прибайкалья и Монголии, для разработки новых подходов к совершенствованию способов контроля клещевых патогенов.

Задачи исследования

1. Оценить разнообразие и распространенность вируса клещевого энцефалита, а также возбудителей наиболее актуальных бактериальных инфекций (*Borrelia burgdorferi sensu lato* и микроорганизмов порядка *Rickettsiales*) в экосистемах Восточной Сибири и Монголии.
2. На модели ВКЭ, с помощью сравнительного анализа биологических свойств и внутривидового генетического разнообразия, установить приоритетные генетические детерминанты, ассоциированные с такими признаками, как специфичность по хозяину, вирулентность для животных и человека, неординарные морфологические или физиолого-биохимические свойства.
3. Методом направленного мутагенеза создать набор рекомбинантных штаммов ВКЭ, различающихся по составу приоритетных генетических детерминант.
4. Сравнить эффективность различных стадий репродуктивного цикла рекомбинантных и контрольных штаммов ВКЭ в культурах клеток млекопитающих, в лабораторных линиях клещей и в мышевидных грызунах.
5. С помощью методов математического анализа, оценить вероятность формирования стабильных популяций ВКЭ в специфичных и неспецифичных экосистемах.

Научная новизна

Впервые охарактеризовано генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита и клещевых бактериальных инфекций, представляющих опасность для человека в Монголии. Установлено, что в обследуемых районах помимо вируса клещевого энцефалита циркулируют *Borrelia garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii* и риккетсиеподобный микроорганизм «Montezuma». Выявлена зараженность клещей *I. persulcatus* ранее не описанными бактериями р. *Burkholderia sp.* и *Pseudomonas sp.* На основе анализа фрагментов геномов, показано, что на территории Восточной Сибири и Монголии циркулируют единые популяции таких патогенов как ВКЭ и *B. burgdorferi sensu lato*.

Впервые доказано, что ВКЭ линии «886-84» представляют опасность для здоровья человека. Изолят РНК ВКЭ MNG TBEV-MN-2008 выделен на территории Монголии из мозга

больного, погибшего от КЭ менингеальной формы. Установлено, что нуклеотидная последовательность фрагмента гена E и транслированная аминокислотная структура белка E изолята MNG TBEV-MN-2008 соответствуют ВКЭ линии «886-84», описаны характерные нуклеотидные и аминокислотные замены.

Впервые экспериментально доказано, что возникающие при адаптации ВКЭ к организму нового хозяина точечные мутации в критических аминокислотных позициях белка E ВКЭ (в частности, 67, 122 и 277 а.о.), экспонированы на поверхности вириона, вызывают сдвиг заряда и/или гидрофобности поверхности вириона ВКЭ и приводят к повышению эффективности репродукции и невяремической трансмиссии ВКЭ в клещах *I. ricinus*. Показано, что у ВКЭ с данным типом адаптивной изменчивости нет способности к формированию устойчивых природных популяций, их доля в общей популяции вируса не превышает 7 %.

Впервые созданы рекомбинантные штаммы ВКЭ сибирского и европейского субтипов, содержащие гетерологичные структурные гены E, ргМ-Е и С-ргМ-Е. Доказана их жизнеспособность, охарактеризован их жизненный цикл в культуре клеток млекопитающих и иксодовых клещах и количественно определена эффективность их невяремической трансмиссии между клещами *I. ricinus*.

Впервые установлено, что устойчивая невяремическая трансмиссия ВКЭ возможна только при точном соответствии целого региона генома, кодирующего 5' НТР, капсидный белок С, мембранный белок ргМ и оболочечный белок E, специфичному виду клеща. Нарушение целостности этого региона приводит к драматическому падению эффективности трансмиссии, а его полная замена на неспецифичный фрагмент генома полностью блокирует передачу ВКЭ между зараженными и незараженными клещами.

Впервые доказано, что вирулентность ВКЭ для клеток млекопитающих определяется свойствами неструктурных генов вируса, однако мутации в структурном гене E существенно модифицируют патогенетические характеристики ВКЭ, что подтверждается повышенной частотой изоляции вирусов с мутацией E67D от больных людей и млекопитающих.

Впервые проведен теоретический анализ влияния генетического разнообразия ВКЭ на устойчивость циркуляции вируса в природе. Показано, что при снижении эффективности невяремической трансмиссии до 27 % и ниже, ВКЭ европейского субтипа будет неспособен устойчиво циркулировать в популяциях *I. ricinus*.

Теоретическая и практическая и значимость результатов

На основе экспериментальных данных продемонстрирована роль генетического разнообразия ВКЭ в поддержании стабильно существующих природных популяций вируса за счет глубокой адаптации комплекса структурных белков вируса к организму специфичного клеща-переносчика. Полученные результаты позволяют теоретически постулировать, что

направленное блокирование взаимодействия поверхностных белков ВКЭ с клетками хозяина в естественных популяциях клещей с высокой вероятностью нарушит процесс неvirемической трансмиссии клещевых микроорганизмов и приведет к существенному снижению зараженности клещей ВКЭ в природе. Результаты сравнительного исследования генетического разнообразия ВКЭ, свидетельствуют о том, что выявленные механизмы влияния генетического разнообразия на формирование устойчивых популяций могут быть применимы к другим природно-очаговым инфекциям *B. burgdorferi sensu lato* и микроорганизмов пор. *Rickettsiales*.

Практическая значимость работы определяется тем, что полученные в ходе исследований данные углубляют общие представления о функционировании природных очагов трансмиссивных инфекций, выявляют уязвимые элементы жизненного цикла микроорганизмов и их хозяев и могут иметь большое значение в разработке современных способов контроля патогенов и профилактики вызываемых ими заболеваний.

В процессе исследований разработаны и внедрены в практику Центра профилактики клещевых инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ следующие базы данных: ИСС «Клеши» (Данчинова Г.А. и др., 2009, свидетельство № 2009620008), ИАС «Полевые клещи» (Хаснатинов М.А. и др., 2011, свидетельство № 2011620140), ИСС «Вакцинация» (Петрова И.В. и др., 2011, свидетельство № 2011620472), ИСС «Регистр-инфекции» (Данчинова и др., 2015, свидетельство № 2015620064), ИСС «Бурятия-клещи» (Данчинова и др., 2017, свидетельство № 2017620505), ИСС «Регистр, Иркутская область» (Данчинова и др., 2018, свидетельство № 2018620668) и программа для ЭВМ «WEB-сервис импорта данных из реляционных таблиц в CSV» (Федоров Р.К. и др., 2017 (свидетельство № 2017615230). Автором получен патент Федеральной службы по интеллектуальной собственности РФ №128552 на полезную модель "Планшет для записей" (Россия 27.05.2013).

Цикл работ по клещевым инфекциям в Монголии имеет большое теоретическое и практическое значение для республики. Благодаря этим исследованиям, была начата официальная регистрация заболеваний, передающихся через укусы иксодовых клещей. Получено 3 патента Республики Монголии №1038 «Хачигт халдвар» (2004), № 5687 «Хачигт халдвар» (2007), № 5687 «Хачигт халдвар» (2013). Результаты совместных исследований внедрены в государственные стандарты эпидемиологического надзора, диагностики и лечения клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза в Монголии.

В рамках диссертационного исследования расшифровано и проанализировано более 100 нуклеотидных последовательностей ВКЭ, *B. burgdorferi sensu lato* и других клещевых микроорганизмов, 91 из которых депонирована в международную базу данных GenBank.

Результаты исследований используются в процессе профессиональной подготовки студентов Иркутского государственного университета и Иркутской государственной сельскохозяйственной академии.

Методология и методы исследования

Методология исследования предусматривала описательный и экспериментальный этапы. На первом этапе было изучено разнообразие ВКЭ и бактериальных патогенов, инфицирующих иксодовых клещей в Прибайкалье и Монголии. Эти исследования были выполнены с помощью **зоолого-паразитологических** (учеты численности, отлов, определение видовой принадлежности иксодовых клещей и мелких млекопитающих), **молекулярно-генетических** (обратная транскрипция (ОТ), ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов генома вирусов и бактерий в плазмидных бактериальных векторах), **вирусологических и микробиологических** (прямая микроскопия, изоляция ВКЭ в культуре клеток, изоляция боррелий в культуральной среде BSK-H и др.) и **статистических** методов. На втором этапе ВКЭ был использован в качестве модели для изучения роли генетического разнообразия клещевых патогенов в их циркуляции между клещами. Работа проведена на основе лабораторной модели неvirемической трансмиссии ВКЭ европейского субтипа в популяции клещей *I. ricinus*. Изучена циркуляция ряда искусственно созданных штаммов ВКЭ, содержащих как точечные мутации в биологически значимых доменах поверхностного белка Е ВКЭ, так и фрагменты генома штамма ВКЭ гетерологичного сибирского субтипа. На этом этапе были использованы **молекулярно-генетические** (ОТ, ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов генома микроорганизмов в плазмидных бактериальных векторах, модификация ВКЭ с помощью направленного мутагенеза, *in vitro* транскрипция, трансфекция культур клеток млекопитающих и др.), **вирусологические** (РНИФ, РГА, РТГА, реакция нейтрализации, оценка вирулентности и репродукции в животных моделях, оценка эффективности неvirемической трансмиссии при экспериментальной инфекции клещей *I. persulcatus*) а также **статистические** методы.

Положения, выносимые на защиту

1. В Восточной Сибири и Монголии, циркулирует широкий спектр клещевых патогенов, который включает вирус клещевого энцефалита, *Borrelia garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii*, микроорганизм «Montezuma». Для каждого из них характерно значительное внутривидовое разнообразие популяций выражающееся, прежде всего, в полиморфизме первичной структуры геномов.

2. Мутации в аминокислотных позициях 67, 122 и 277 белка E приводят к утрате ВКЭ гемагглютинирующей активности, снижению скорости репродукции в культуре клеток млекопитающих, улучшению репродукции в слюнных железах клещей во время питания, повышению эффективности невяремической трансмиссии между *I. ricinus*, однако не способствуют формированию устойчивых природных популяций соответствующих штаммов ВКЭ.

3. Вирулентность ВКЭ в культуре клеток млекопитающих определяется свойствами неструктурных белков вируса, а патогенность для лабораторных мышей – свойствами структурных белков.

4. Эффективность репродукции ВКЭ в слюнных железах нимф и самок *I. ricinus*, а также невяремической трансмиссии вируса между заражёнными и незараженными клещами, зависит от свойств структурных генов и эффективности взаимодействия их ансамбля с организмом беспозвоночного хозяина.

5. Одним из наиболее значимых факторов формирования генетического разнообразия ВКЭ является адаптация вируса к процессу невяремической передачи между доминирующими в данном регионе клещами.

6. Моделирование естественной циркуляции ВКЭ европейского субтипа среди клещей *I. ricinus* на основе расчета репродуктивных чисел инфекции (R_0) указывает на то, что устойчивость природных очагов КЭ зависит от эффективности невяремической трансмиссии среди местных популяций клещей и целенаправленное снижение эффективности невяремической трансмиссии приведет к существенному снижению зараженности клещей в природе.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования обеспечена использованием современных методов описательных и экспериментальных исследований, достаточным объемом полученной и проанализированной информации, воспроизведением экспериментальных исследований во множественных повторах, разносторонним анализом и адекватной статистической обработкой полученных материалов.

Основные результаты диссертационной работы апробированы на российских и зарубежных научных конференциях и конгрессах различного уровня, в том числе на: Всероссийской научной конференции "Клинические перспективы в инфектологии» (Санкт-Петербург 2001); Научно-практической конференции «Клещевые боррелиозы» (Ижевск, 2002); Международной научно-практической конференции Бурятской СХА (Улан-Удэ, 2008); XIV International congress of Virology (Istanbul, 2008); Научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицинской вирусологии» (Москва, 2009); The Int. Conf. «Zoonotic

infectious diseases and tourism» (Ulaanbaatar, 2009); 12th SAC Seminar «Combating Global Infections» (Irkutsk, 2009); 14th International Congress on Infectious Diseases (Miami, USA, 2010); The international conference «Current issues on zoonotic diseases» (Ulaanbaatar, 2010); Ministry of health-80 years- scientific conference (Ulaanbaatar, 2010); XV International Congress of Virology (Sapporo, Japan, 2011); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты природной очаговости болезней» (Омск, 01-02 ноября 2011); Международной научной конференции «Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами» (Иркутск, 26-29 июня 2012 г.); Российской научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы клещевого энцефалита» (Москва, 8–10 октября 2013 г.); 14th National Conference «Current Topics of Virology» (Ulaanbaatar, Mongolia, 2013); Международной конференции «Current issues: Zoonotic Diseases» (Ulaanbaatar, Mongolia, 26th June 2015); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека» (Омск, 15–16 ноября 2016 г.); I Заседании Российско-Кубинской рабочей группы по научно-практическому сотрудничеству (Гавана, Куба, 6-9 декабря 2016 г.); III Байкальской международной научной конференции «Природно-очаговые трансмиссивные инфекции» (Иркутск, 27-29 сентября 2018 г.); Международном научно-практическом семинаре «Diagnostics and prophylaxis of Tick-Borne Infections» (Sukhbaatar, Mongolia, 4-5 April 2019) и др.

Место выполнения и личный вклад автора

Большая часть исследований выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ), г. Иркутск. Генно-инженерные работы по модификации генома ВКЭ выполнены на базе Центра экологии и гидрологии «Оксфорд» NERC (Великобритания) а также на базе Университета г. Ридинг (Великобритания). Лично автором, либо при его непосредственном участии были выполнены разработка идеи и дизайна исследования, сбор и обработка полевых материалов, экспериментальные исследования (вирусологические эксперименты, ПЦР, ИФА, молекулярно-генетические исследования, генно-инженерные работы), анализ и интерпретация экспериментальных данных (включая филогенетический и статистический анализ), подготовка публикаций, формулировка выводов.

Часть работ по изучению генетического разнообразия *B. burgdorferi sensu lato* выполнена в сотрудничестве с к.б.н. О.В. Строниным (НПО «Вирион», филиал ГПУ НПО «Микроген», г. Томск) и к.б.н. Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и фундаментальной медицины РАН, Новосибирск) при непосредственном участии автора. Экспериментальные работы по неvirемической трансмиссии ВКЭ были проведены в рамках совместных исследований Dr. M. Kazimirova и Dr. M. Slovak (Институт зоологии Академии наук Словакии, Братислава), а также

Dr. B. Klempa (Институт вирусологии АН Словакии, Братислава). Автором лично были проведены обработка, анализ и интерпретация полученных на этом этапе экспериментальных результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, двух глав обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения и выводов, списка литературы. Работа изложена на 256 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 17 таблицами. Список использованной литературы содержит 411 источников, из которых 106 – на русском языке и 305 – на иностранных языках.

Благодарности

Автор выражает благодарность директору ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ д.м.н., проф. Рычковой Л.В. и научному руководителю ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ акад. РАН, проф. Колесниковой Л.И. за предоставление возможности проведения исследований, сотрудникам лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ под руководством д.б.н. Г.А. Данчиновой за помощь в проведении работ; акад. РАН, проф. В.И. Злобину (ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» МЗ РФ), д.б.н. С.И. Беликову (ЛИН СО РАН), [T.S. Gritsun](#) и проф. Е.А. Gould за консультативную и практическую поддержку; д.м.н. И.В. Козловой (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ), к.б.н. О.В. Стронину (НПО «Вирион», филиал ФГПИУ НПО «Микроген», Томск), к.б.н. Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск) за плодотворное сотрудничество. Автор благодарен А.К. Tuplin, M. Kazimirova, M. Slovak, B.Klempa, а также сотрудникам Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН (Москва) проф. В.В. Погодиной, [Т.В. Флоровой](#), Н.Г. Бочковой и Л.С. Левиной за помощь в экспериментальных исследованиях.

Также автор выражает благодарность сотрудникам Национального Центра инфекционных заболеваний МЗ Монголии проф. Д. Нямхуу, Д. Абмэд и Ж. Батаа, сотрудникам Национального Центра зоонозных инфекций МЗ Монголии проф. Д. Отгонбаатар, проф. Н. Цогтбадрах, Д. Цэрэнноров, Н. Эрдэнэбат и др. коллегам за помощь при проведении полевых исследований и сбора материалов на территории Монголии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе **Введение** обоснована актуальность исследования, поставлена цель работы и сформулированы задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели. Описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, охарактеризована степень достоверности результатов. Приведена информация о публикации результатов работы

и их внедрении в практику, апробации работы, личном вкладе автора, структуре и объеме диссертации.

В **Главах 1 и 2** приведен обзор литературы, характеризующий современные знания о разнообразии вируса клещевого энцефалита (Глава 1), *Borrelia burgdorferi sensu lato* и наиболее эпидемически актуальных микроорганизмов порядка *Rickettsiales* (Глава 2). Проанализировано современное состояние исследований разнообразия клещевых инфекций, их экологические и биологические особенности.

Глава 3. Материалы и методы

3.1 Материалы

В работе были исследованы иксодовые клещи, образцы сывороток крови больных людей и людей, обратившихся с укусами клещей, штаммы, изоляты и образцы РНК ВКЭ, изоляты и образцы ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, а также микроорганизмов, относящихся к порядку *Rickettsiales*.

Из природных сообществ было исследовано 2839 клещей вида *I. persulcatus* и 815 клещей рода *Dermacentor*, среди которых 48 были определены как *D. silvarum*, и 206 - как *D. nuttalli*. Клещи *I. ricinus*, использованные в экспериментальных исследованиях, были выращены в лабораторной колонии Institute of Zoology, Slovak Academy of Science (Братислава, Словакия). В работе использовано 45 образцов сывороток крови от больных с подозрением на КР или с наличием лихорадки неустановленной этиологии. Исследования материалов от людей проводили в соответствии с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека» (2000г.) («Хельсинская декларация...», 2000) и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (2003 г.) (Приказ №226..., 2003). На выполнение исследований имеется Заключение комитета по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Исследовано 15 штаммов ВКЭ, полученных из естественных источников, 13 искусственно созданных мутантных и рекомбинантных штаммов ВКЭ и 4 образца РНК ВКЭ, выделенных из клещей *I. persulcatus* и мозга погибшего больного. Для поддержания всех штаммов использовали культуру клеток СПЭВ. Часть штаммов (Яр 114, Яр 46-2, Яр 48, Яр 71) была предоставлена для исследования сотрудниками Института полиомиелита и вирусных энцефалитов под руководством проф. В.В. Погодиной. Штаммы 1G-98, 2517-05, 3869-03, 413-04 получены из коллекции вирусов клещевого энцефалита ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Типовые штаммы Нурт и Васильченко были взяты из коллекции Т.S. Gritsun (Centre for ecology and hydrology "Oxford" NERC, Великобритания). Проанализировано 6 изолятов *B. burgdorferi sensu lato* от клещей *I. persulcatus* из Монголии и 15 ДНК боррелий из Монголии и Иркутской области. Изоляция боррелий проведена О.В. Строниным в ФГУ «НПО Виррион» (Томск), секвенирование выполнено Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и

фундаментальной медицины, Новосибирск). Исследовано 40 образцов ДНК микроорганизмов пор. *Rickettsiales*, инфицирующих клещей *I. persulcatus*, *D. nuttalli* и *D. silvarum*.

В работе использовали перевиваемую культуру клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ. Клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (БиоЛот, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин+стрептомицин) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone), инкубировали при 37°C в атмосфере с 5%CO₂ и пересеивали согласно паспорту 1 – 2 раза в неделю.

3.2.Методы

Отлов, определение вида и подготовку клещей для исследования выполняли по общепринятым методикам. ВКЭ изолировали и культивировали в культуре клеток СПЭВ. Для исследования брали изоляты с короткой историей, не превышающей 2-6 пассажей. Изоляцию *B. burgdorferi sensu lato* проводили в полной среде BSK-H со смесью антибиотиков. На этапах выделения ДНК/РНК и ОТ-ПЦР не использовали положительные контроли для устранения возможности контаминации. Отрицательные контрольные реакции проводили на всех этапах анализа. Для того чтобы исключить ошибки ДНК-полимераз, каждый образец РНК анализировали в 2 независимых повторах ОТ-ПЦР и ПЦР-фрагменты от каждого повтора анализировали отдельно. ОТ проводили либо с использованием ревертазы Superscript II (Invitrogen) и случайных гексануклеотидов (MWG, Германия), либо с использованием наборов Reverta-L («Амплиценс», Москва) согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием высокоточных ДНК-полимераз. Секвенирование проводили по методу Сангера с помощью анализатора Beckman Coulter Genetic Sequencing System 1800 (USA) и соответствующих наборов реагентов в лаборатории аналитической биоорганической химии (руководитель С.И. Беликов) Лимнологического института СО РАН, либо с использованием коммерческого сервиса («Синтол», Москва). Нуклеотидные последовательности образцов от каждого повтора ОТ-ПЦР сравнивали между собой и составляли консенсусную последовательность, которую использовали для дальнейшего анализа. Для редактирования и анализа последовательностей использовали инструменты программы BioEdit. Идентификацию вирусов и бактерий, а также выявление эволюционных и эколого-географических взаимосвязей производили с помощью филогенетического анализа расшифрованных фрагментов как минимум двумя независимыми методами – методом объединения ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ) и методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Оптимальную эволюционную модель расчета генетических дистанций для каждого набора последовательностей определяли индивидуально с помощью программы Modeltest. Кроме того, использовали пятипараметрическую модель эволюции Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993). Оценку достоверности реконструкции

эволюционных взаимоотношений проводили с помощью бутстреп-анализа на основе не менее 100 псевдовыборок. Поддержку узлов выше 70% считали достоверной при длине фрагмента 1000 н.о. и более, при длине фрагмента менее 1000 н.о. считали достоверной поддержку 50% и выше. Филогенетический анализ проводили с помощью инструментов программ MEGA 4.1. (Kumar, Tamura, Nei, 2004) и MEGA 6 (Tamura K., 2013).

Общая схема инфекционного клонирования соответствовала ранее опубликованной (Gritsun T.S., Gould E.A., 1998). Для получения инфекционного клона штамма Нург (Нург IC) геном вируса амплифицировали в высокоточной длиноразмерной ПЦР в виде трех перекрывающихся ампликонов, на основе которых были созданы две плазмиды, рАТVНург1-3159 и рDGHург3154-10835, кодирующие 5' и 3' части генома Нург соответственно. С 5'-конца плазмиды рАТНург1-3159 был добавлен сайт узнавания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы SP6. При этом в позициях 3154-3159 у обоих субклонов содержался уникальный сайт рестрикции ClaI (AT_CGAT). Для восстановления инфекционного клона, обе плазмиды линеализовали и лигировали между собой по сайту ClaI. Инфекционный клон типового штамма Васильченко (Vs IC) описан ранее и представляет собой две плазмиды, рGGVs[660-1982]H и рGGVs[660-1982del], которые лигируются по уникальным сайтам рестрикции AgeI и Sse838 (Gritsun T. S., Gould E.A., 1998; Gritsun T.S. и др., 2001).

Для введения точечных мутаций в геном Vs IC нами была разработана методика мегапраймер-опосредованной химеризации вирусов. Мутации вводили в плазмиду рGGVs[660-1982]H. Двухцепочечные ДНК-мегапраймеры длиной ~200 н.о. амплифицировали с помощью высокоточной ПЦР с кДНК Vs IC в качестве матрицы. Для каждого мегапраймера в один из праймеров вводили необходимые нуклеотидные замены, чтобы обеспечить целевые аминокислотные мутации в ген E Vs IC. После этого, мегапраймеры использовали для циркулярной ПЦР с плазмидой рGGVs660-1982H в качестве матрицы. Каждый цикл ПЦР производил полуразомкнутые молекулы дцДНК, причем замкнутая цепь ДНК происходила от матричной ДНК рGGVs660-1982H дикого типа, а разомкнутая цепь ДНК представляла новообразованную мутантную молекулу. После завершения 15 циклов ПЦР в реакционной смеси накапливались дважды разомкнутые циркулярные дцДНК, состоящие только из новообразованных мутантных молекул. При этом разрывы цепей были сдвинуты относительно друг друга на длину мегапраймера (~ 200 н.о.), что обеспечивало стабильность мутантных плазмид. Поскольку матричная плазмидная ДНК дикого типа была произведена в бактериях *E. coli*, все молекулы дикого типа были dam-метилованы по каждому сайту 5'-GATC-3', а в новосинтезированных мутантных молекулах эти сайты оставались интактны. Поэтому, после обработки эндонуклеазой DpnI все матричные плазмиды оказывались лизированы, а в смеси оставались только мутантные ПЦР-копии. Далее ПЦР-продуктом трансформировали клетки *E.*

coli (штамм AbleK), определяли полную нуклеотидную последовательность мутантных плазмид нескольких колоний и из них выбирали для дальнейшей работы одну колонию, не содержащую никаких замен, кроме целевой мутации.

Инфекционные клоны 2 контрольных и 7 рекомбинантных и штаммов ВКЭ, содержащих взаимозаменяемые фрагменты геномов Vs IC и Нург IC, были сконструированы с использованием ряда промежуточных плазмид и стандартных методов генетической инженерии. Основой для конструирования послужили плазмиды инфекционных клонов Vs IC и Нург IC. Все итоговые плазмиды, полученные в результате рекомбинаций были секвенированы по полной длине вставки фрагмента генома ВКЭ. Для восстановления каждого рекомбинантного или мутантного штамма ВКЭ, две плазмиды обрабатывали соответствующими рестриктазами и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы между собой. Полноразмерный инфекционный клон линейаризовали рестриктазой SmaI и использован в качестве матрицы в *in-vitro* транскрипции с помощью SP6 РНК. Транскрибированную РНК вводили в клетки СПЭВ с помощью реагента трансфекции Lipofectin (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Клеточный супернатант и монослой собирали на 2-4 день после заражения в зависимости от наличия цитопатического действия. Наличие инфекционного вируса в клетках подтверждали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к белку Е флавивирусов и с помощью ОТ-ПЦР. Геномы полученных рекомбинантных штаммов ВКЭ были расшифрованы а нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа KP716971 - KP716978.

Концентрацию инфекционного ВКЭ определяли с помощью титрования бляшкообразующих единиц и выражали в виде Ig БОЕ/мл, характеристику морфологии бляшек и оценку цитопатического действия ВКЭ выполняли общепринятыми способами в культуре клеток СПЭВ. Для оценки стабильности созданных вирусов при проведении экспериментальных процедур, мы подвергли идентичные аликвоты двух контрольных (Vs IC и Нург IC) и двух рекомбинантных (Vs [Нург str] и Нург [Vs str]) штаммов ВКЭ воздействию физических условий, имитирующих экспериментальные или более экстремальные. Для каждого штамма ВКЭ было приготовлен и заморожен при -80°C исходный сток из 50 идентичных аликвот по 0,5мл суспензии. В качестве контрольного значения использовалась аликвота исходного стока ВКЭ, хранившаяся без единой разморозки при -80°C в течение всего эксперимента. Условие «однократное замораживание» - аликвоту ВКЭ оттаивали при комнатной температуре, повторно замораживали при -80°C и хранили до титрования; «6-кратное замораживание» - цикл замораживание-оттаивание повторяли 6 раз, замораживали при -80°C и хранили до титрования; «6-кратное замораживание, 48ч. при 37°C » - аликвоту ВКЭ после 6 циклов замораживание-оттаивание инкубировали при 37°C в течение 48 ч.; «40 мин при

+40°C и 40 мин при 37°C» - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 40 мин при +40°C и затем 40 мин при 37°C; «48 часов при +37°C» - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 48 ч. при 37°C; «48 часов при +42°C» - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 48 ч. при 42°C. Инфекционность ВКЭ в каждой аликвоте определяли титрованием БОЕ одновременно после завершения всего цикла опытов. Эксперимент проводили в 3 независимых повторах.

Для оценки динамики репродукции ВКЭ монослой клеток СПЭВ заражали соответствующим вирусом с множественностью инфекции 1 БОЕ \ клетку. Отбор проб объемом 150 мкл. производили с интервалом 4 часа в течение первых суток, и далее ежедневно до 72 часов после заражения. Эксперимент проводили в 3 независимых повторах. Для изучения эффективности неvirемической трансмиссии (ЭТ) и репродукции (ЭР) ВКЭ в клещах *I. ricinus*, двух зараженных самок (500 БОЕ \ самку) через 14 - 21 день после заражения и 15 незараженных нимф оставляли совместно питаться на лабораторной мышив течение 3 суток. После окончания питания нимф-реципиентов и слюнные железы самок-доноров использовали для определения титров инфекционного ВКЭ с помощью титрования БОЕ. ЭТ определяли как долю (в процентах) зараженных нимф из всех напитавшихся. ЭР оценивали по величине титров (БОЕ/мл) ВКЭ в суспензиях нимф или слюнных желез самок *I. ricinus*. Для каждого трансмиссионного эксперимента использовали параллельно 2 мыши и производили не менее 4 независимых повторов. Мышей-прокормителей через 21 день подвергали эвтаназии и забирали образцы сыворотки крови для серологического подтверждения факта заражения ВКЭ. Эксперименты с лабораторными животными проводили в соответствии с руководствами по работе с животными (Act of the Government of the Slovak Republic 2003 regulating the use of experimental animals). Все эксперименты были одобрены State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic (разрешения № 12284/03-220 и № 2362/06-221).

Для каждого набора данных рассчитывали среднее значение и рассчитывали стандартное отклонение и 95% доверительный интервал. Оценку достоверности различий между выборками в большинстве случаев проводили на основе t-критерия Стьюдента. Оценку достоверности различий между ЭТ разных выборок производили на основе U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализ выживаемости мышей-прокормителей проводили с помощью метода Каплана-Мейера. Для выявления взаимосвязей между переменными рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Корреляционную связь считали статистически значимой при $R \geq 0,7$ ($p=0,05$). Расчеты проводили с помощью программ SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., USA), Statistica 6.1 (StatSoft) и MS Office Excel (Microsoft Corporation, 1985-2003).

Глава 4. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, и альфа-1-протобактерий в Восточной Сибири и Монголии как фактор формирования стабильных популяций микроорганизмов в специфических эколого-географических условиях

4.1. Полиморфизм ВКЭ

Основные материалы для изучения разнообразия клещевых микроорганизмов были собраны в Иркутской области и Монголии. Для проведения анализа филогеографических взаимосвязей ВКЭ выделено 7 регионов согласно географическим границам основных растительных комплексов северной и центральной Евразии (Атлас..., 1964) а также естественным физическим препятствиям (крупные водостоки, горные массивы) (табл. 1).

Таблица 1. Территориальное районирование Евразии для анализа филогеографических взаимосвязей изолятов ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии

Регион (акроним в рисунках и таблицах)	Естественные границы	Фоновые виды клещей	Кол-во изолятов ВКЭ	Вовлеченные административные территории
Дальний Восток (FE)	От побережья Тихого океана на востоке до границ бассейна р. Амур на западе.	<i>I. persulcatus</i> , <i>H. concinna</i> , <i>D. silvarum</i>	104	Приморский край, Хабаровский край и Читинская область РФ, Курильские острова, о-в Сахалин, Камчатка, Япония, Южная Корея,
Китай (С)	Северо-восток Китая, большой Хинганский хребет	<i>I. persulcatus</i> , <i>H. concinna</i> , <i>D. silvarum</i>	14	Китайская народная республика, провинции Цзилинь, Хэйлундзянь, автономный район Внутренняя Монголия
Восточная Сибирь и Монголия (ESM)	От границ бассейна р. Селенга и оз. Байкал на востоке до бассейна р. Енисей на западе.	<i>I. persulcatus</i> , <i>D. nuttalli</i> , <i>D. silvarum</i>	39	Монгольская народная республика, Республика Бурятия, Иркутская область, Красноярский край
Западная Сибирь (WS)	Бассейн р. Обь и прилегающие водосборы Северного Ледовитого океана.	<i>I. persulcatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>D. marginatus</i>	159	Томская, Новосибирская, Кемеровская, Омская, Тюменская области, Республика Алтай
Урал (U)	Уральский хребет	<i>I. persulcatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>D. marginatus</i>	207	Уральский Федеральный округ РФ, Башкирия.
Европейская часть РФ (EuRu)	От границ бассейна р. Волга на востоке до побережья Балтийского и Черного морей на западе.	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>	34	Центральный и Северо-западный Федеральные округа РФ.
Западная Европа WEu	От границ бассейнов рек Днепр и Дон на востоке до побережья Атлантического океана на западе	<i>I. ricinus</i>	265	Страны Евросоюза, Украина, Белоруссия.
Кыргызстан (Kurg)	Кыргызстан	НД	2	Кыргызстан

В анализ включено 824 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E ВКЭ длиной 339 н.о. Фрагмент кодирует позиции 108 – 220 белка E и захватывает основные аминокислотные маркеры субтипов вируса. На филогенетическом древе выделялись все основные кластеры ВКЭ: 3 основных субтипа ВКЭ, линии «Васильченко», «Заусаев», «Балтийская» внутри СИБ субтипа, линии «886-84», «Senzhang» и «Софьин» внутри ДВ субтипа, сравнительно гомогенный E-ВКЭ субтип. Общая топология древа совпадала с ранее опубликованными реконструкциями на основе полноразмерного гена E (Hayasaka D, 2001; Gritsun, 2003za; Golovljova I., 2008], за исключением вирусов линии «Oshima», которые в нашей реконструкции группировались вместе с изолятами ВКЭ линии «Софьин».

Все основные кластеры формировались идентично вне зависимости от используемого метода анализа. Можно отметить явную ассоциацию формирования эволюционных линий с географическим местом изоляции ВКЭ (табл. 2). Каждая из внутривидовых групп ВКЭ оказалась ассоциирована со специфичным местом обитания, ограниченными пределами экосистемы большего или меньшего размера. Так, ДВ-ВКЭ линии «Senzhang» ассоциированы с экосистемами юга Дальнего Востока и северных провинций Китая, вирусы линии «886-84» свойственны восточносибирским природным сообществам и приурочены главным образом к экосистемам бассейна р. Селенга. СИБ-ВКЭ линии «Заусаев» характерен для экосистем Уральского хребта а «Балтийская» линия СИБ-ВКЭ ассоциирована с популяциями *I. persulcatus*, обитающими в Европейской части РФ и не встречается на территориях восточнее Урала. E-ВКЭ ассоциирован с экосистемами Западной Европы, и появляется в пределах ареала *I. persulcatus* только в виде единичных заносных популяций (например, «Алтайская» и «Корейская» линии), скорее всего, неспособных к устойчивой циркуляции среди неспецифичных хозяев.

Выборка изолятов ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии составила в целом 39 нуклеотидных последовательностей фрагмента белка E, из которых 8 вирусов были изолированы в Монголии и 31 – в Иркутской области, Красноярском крае и Республике Бурятия. Среди восточносибирских и монгольских изолятов ожидаемо преобладали вирусы Сибирского субтипа ВКЭ (72,5%), при этом 16 изолятов (41 %) относились к линии «Васильченко», а 12 (30,8%) - к линии «Заусаев».

Таблица 2. Ассоциация эволюционных линий ВКЭ с регионом обитания

Эволюционная линия	Общее количество изолятов ВКЭ из линии	Доля ВКЭ*, изолированных в указанном регионе**, %							
		FE	C	ESM	WS	U	EuRu	WEu	Kyrg
СИБ-ВКЭ «Заусаев»	275	0,4	0,0	4,4	32,7	61,5	1,1	0,0	0,0
СИБ-ВКЭ «Балтийская»	61	0,0	0,0	0,0	4,9	29,5	42,6	21,3	1,6
СИБ-ВКЭ «Васильченко»	80	7,5	0,0	20,0	70,0	0,0	0,0	1,3	1,3
ДВ-ВКЭ «886-84»	9	33,3	0,0	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ДВ-ВКЭ «Senzhang»	22	63,6	36,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ДВ-ВКЭ «Софьин»***	111	61,3	5,4	2,7	8,1	18,0	1,8	2,7	0,0
Е-ВКЭ	266	4,5	0,0	0,8	0,4	0,0	1,1	93,2	0,0

* Для каждой эволюционной линии ВКЭ указана доля вирусов от общего количества, изолированных в данном регионе, формирующих эту линию ВКЭ;

** - в соответствии с табл. 2;

*** - В линию «Софьин» включены 2 изолята группы «Кам-Ноккайдо», которые формировали отдельную ветвь на общем филогенетическом древе.

Кроме того, существенную долю составляли ДВ-ВКЭ линии «886-84» (15,4 %), а ДВ-ВКЭ линии «Софьин» и Е-ВКЭ встречались в единичных случаях (7,7 % и 5,1 % соответственно). Изолятов «Балтийской» линии СИБ-ВКЭ и линии «Senzhang» ДВ-ВКЭ в исследуемом регионе не обнаружено. При анализе филогеографических взаимосвязей ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии оказалось, что образцы вирусов из Монголии в большинстве случаев группируются с изолятами из Иркутской области, Республики Бурятия и Красноярского края (рис. 1).

Помимо прочего, изучение разнообразия ВКЭ в Иркутской области и Монголии позволило установить, что вирусы линии «886-84» представляют серьезную опасность для здоровья человека. Так, изолят MNG TBEV-MN-2008 выделен нами из мозга больного, который был инфицирован на территории Монголии и погиб от КЭ в менингеальной форме. По нуклеотидной последовательности этот изолят однозначно группируется с вирусами линии «886-84» изолированными в Республике Бурятия (рис. 1). Анализ транслированной аминокислотной последовательности этого изолята показал, что структура функциональных элементов анализируемой части белка – гликозамингликан-связывающего эпитопа в локусе 122-124, «шарнирных» локусов 132-136 и 188-196, сайта гликозилирования 154-156 - соответствует структуре подавляющего большинства изолятов ВКЭ.

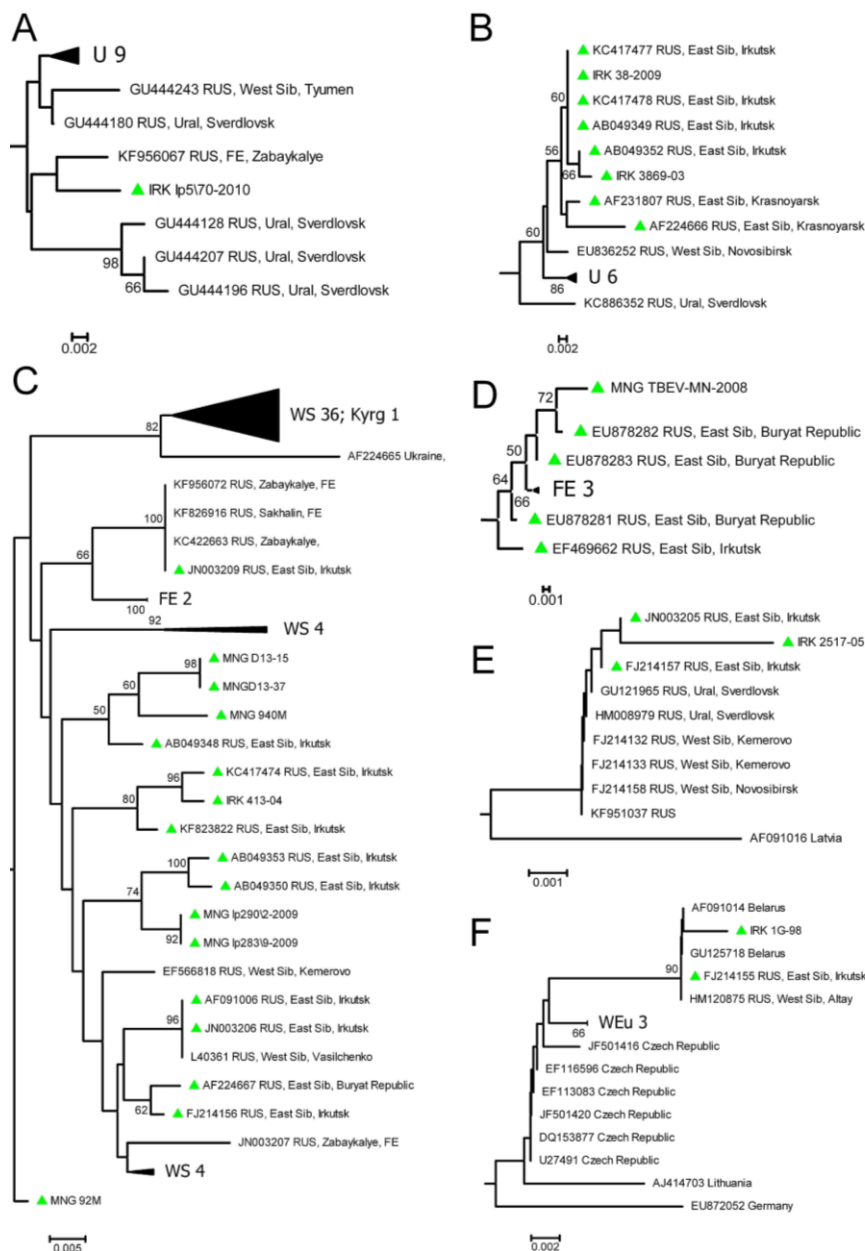


Рисунок 1. Филогеографические связи ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии. Кластеры экстрагированы из общего филогенетического дерева 824 изолятов ВКЭ. **А** и **В** – линия «Заусаев» СИБ-ВКЭ; **С** – линия «Васильченко» СИБ-ВКЭ; **Д** – линия «886-84»; **Е** – линия «Софьин» ДВ-ВКЭ; **Ф** – кластер Е-ВКЭ, содержащий ВКЭ из Иркутской области. Изоляты из Восточной Сибири и Монголии обозначены зеленым треугольником. Для каждого таксона указан номер нуклеотидной последовательности в GenBank географическое место изоляции вируса

Аминокислота в позиции 120 белка Е соответствует маркеру ДВ-ВКЭ (серин), в то время как в позиции 206 – маркеру СИБ-ВКЭ (лейцин). Аминокислотная последовательность фрагмента идентична последовательности вируса 886-84 за исключением двух мутаций - Н86R и V167A (рис. 2). Мутация Н86R является уникальной и приводит к увеличению гидрофильности участка белка Е в локусе 83-88 а.о. с 0,5-1 до 1-1,5 по шкале Норр and Woods (Норр and Woods, 1981). Картирование этой замены на третичной структуре белка Е (вирус

Neudoerfl, номер 1SVB в базе данных PDB) показывает, что топологически данная позиция расположена в локусе 84-87, который экспонирован на внешней поверхности вириона.

4.2. Полиморфизм *B. burgdorferi sensu lato*

Для оценки видового разнообразия и генетической variability *B. burgdorferi sensu lato* в Прибайкалье и Монголии использовали ген 16S rRNA, межгенный спейсер 5S-23S rRNA (*rrfA-rrlB*) и плазмидные гены *p83/100* и *OspA*, кодирующие соответствующие поверхностные белки. В настоящее время эти локусы являются одними из ключевых генетических маркеров при идентификации боррелий, характеристике их внутривидовой структуры, а также при выделении новых видов *B. burgdorferi sensu lato*. Анализ гена 16S rRNA 16 изолятов из Монголии и Иркутской области с гомологичными последовательностями типовых штаммов 16 видов *B. burgdorferi sensu lato* позволил установить, что на обследуемой территории циркулируют *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. afzelii*, при этом *B. garinii* представлены как Евразийской группой 20047 так и Азиатской группой NT29. Для всех исследованных изолятов была характерна высокая консервативность 16S rRNA - их внутривидовой полиморфизм 16S rRNA не превышал $0,002 \pm 0,0004$, а различия между разными видами *B. burgdorferi sensu lato* составили в среднем $0,017 \pm 0,002$ замены на сайт. Анализ последовательностей межгенного спейсера подтвердил, что исследуемые изоляты боррелий представлены двумя видами комплекса *B. burgdorferi s.l.* - *B. garinii* и *B. afzelii* (рис. 3). Изоляты *B. garinii* ожидаемо формировали две внутривидовые группы, при этом изолят *B. garinii* Mng 47-02 относился к евразийской группе 20047, а изолят *B. garinii* Mng 16-02 - к азиатской группе NT29. Изолят *B. bavariensis* Pbi с высокой степенью достоверности (бутстреп поддержка 92%) формировал отдельный кластер (рис. 3). Среди опубликованных в GenBank последовательностей изолятов евразийской группы наиболее близкими оказались *B. garinii*, изолированные на Урале от лесной мышовки и таежного клеща, а также неохарактеризованный китайский изолят. В азиатской группе, наиболее филогенетически близкими по структуре 5S-23S rRNA спейсера оказались изоляты от мышевидных грызунов и клещей в Китае и Японии (Postic D. и др., 1994; Chu C.Y. и др., 2008], а ближайшие родственные изоляты из сопредельных территорий России (*B. garinii* D28, *B. garinii* Ip-51, Западная Сибирь) формировали отдельный кластер (рис. 3). Выборка из 384 опубликованных в GenBank последовательностей 5S-23S rRNA спейсера *B. afzelii* формировала 4 эволюционных линии, включающие 8 кластеров. Четыре из восьми кластеров *B. afzelii* состояли исключительно из европейских изолятов, при этом исключительно азиатских кластеров обнаружено не было.

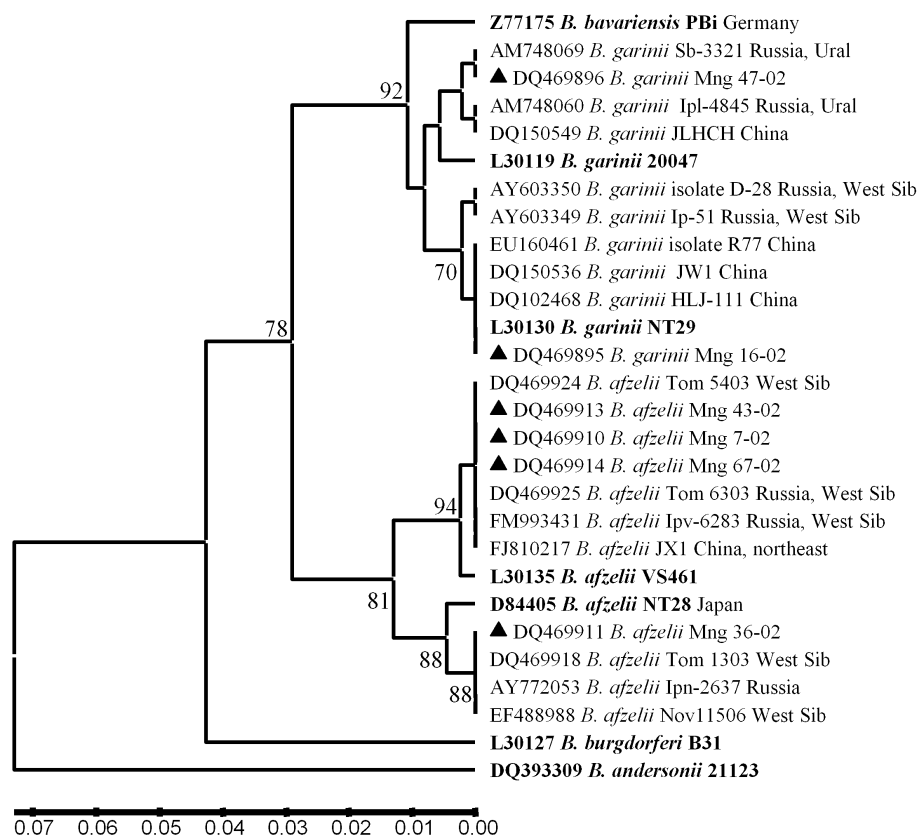


Рисунок 3. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основании нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 5S-23S rRNA *B. burgdorferi* s.l. с использованием метода UPGMA. Последовательности типовых штаммов выделены жирным шрифтом. Изоляты из Монголии обозначены черными треугольниками. Значения бутстреп-поддержки выше 70% отображены рядом с соответствующими узлами дендрограммы. Шкала генетических дистанций эквивалентна 0,01 нуклеотидной замене на сайт и приведена внизу.

В противоположность этому, выборка из 378 последовательностей *B. garinii* группировалась в 15 эволюционных линий, причем одна из них включала недавно выделенный вид *B. bavariensis*. Один из кластеров *B. garinii*, соответствующий группе NT29, состоял исключительно из азиатских изолятов. На более мелком уровне существенных взаимосвязей между нуклеотидной структурой спейсера и географическим местом изоляции боррелий выявлено не было. Необходимо отметить, что статистическая поддержка кластеризации в пределах обоих видов была низкой, как правило, ниже 50 %. Наши данные совпадают с результатами анализа других авторов, которые также указывают на наличие сложной внутривидовой структуры *B. garinii* (Нефедова В. В., 2010 и др.).

Анализ гена р83/100 (Фоменко Н.В., 2007) показал, что изоляты *B. afzelii* из Монголии группируются с боррелиями, обнаруженными в Западной Сибири, а изолят *B. garinii* Mng 47-02 также был наиболее эволюционно близок западносибирским изолятам *B. garinii* группы NT29. В целом, согласно последовательностям гена р83/100, внутривидовая структура популяций *B. garinii* значительно сложнее, чем наличие евразийской (20047) и азиатской (NT29) групп. Однако небольшой объем образцов (всего 39 нуклеотидных последовательностей) и их

ограниченное географическое происхождение – 74 % исследованных изолятов получены в Западной Сибири – свидетельствуют о том, что генетическое разнообразие *B. garinii* по этому фрагменту гена в регионе еще не достаточно охарактеризовано.

Структура гена OspA (Фоменко Н.В., 2009) проанализирована для 4 изолятов *B. afzelii* и 2 изолятов *B. garinii* из Монголии и проведено ее сравнение с полноразмерными последовательностями гена OspA 128 изолятов *B. burgdorferi sensu lato*, опубликованных в базе данных GenBank. *B. afzelii* представляют монофилетичный кластер близкородственных изолятов вне зависимости от географического места изоляции или организма хозяина. При этом достоверной внутривидовой структурированности *B. afzelii* по свойствам белка OspA не наблюдалось – статистическая поддержка любого из узлов была ниже 50%. Таким образом, можно предположить, что на всем протяжении ареала от Японии до Западной Европы обитают *B. afzelii* с практически идентичной структурой белка OspA. Филогенетический анализ гена OspA *B. garinii* показал, что в монгольских экосистемах циркулируют боррелии родственные скорее дальневосточным формам, нежели европейским – исследованные изоляты с высокой степенью достоверности относятся к группе «Extremiorientalis» и не соответствуют ни одному из европейских серотипов. При анализе расширенного набора из 227 изолятов *B. garinii* на основе фрагментов гена OspA длиной 315 н.о., формировалось 4 «субкластера», однако статистическая поддержка кластеризации не превышала 50 %. Субкластер 1 изоляты из Монголии, группировавшиеся в разных ветвях с наибольшим сродством дальневосточным (Mng47-02) и с дальневосточными и западносибирскими изолятами (Mng16-02). Субкластер 2 объединял изоляты из Хабаровского края, Китая, Японии, и Западной Сибири. В субкластер 3 входили *B. garinii*, изолированные на территории Западной Европы, Западной Сибири и в Японии, но в нем отсутствовали изоляты с Дальнего Востока РФ или из Китая. Этот кластер соответствовал группе 20047, выделяемой по последовательности межгенного спейсера *grfA-rrlB*, а также включал изоляты OspA серотипов 3 и 7. Субкластер 4 включал большое количество изолятов из Западной Европы, Западной Сибири и Хабаровского края, но ни одного изолята из Китая или Японии.

Таким образом, установлено, что на территории Восточной Сибири и Монголии циркулируют три вида боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* – *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. afzelii*. Анализ трех переменных фрагментов генома – спейсера *grfA-rrlB*, гена мембранного белка p83/100 и гена поверхностного белка OspA – выявил существенное внутривидовое разнообразие *B. garinii* и *B. afzelii* в обследованных районах. Изоляты *B. afzelii* отличаются высокой степенью родства на всей протяженности ареала, однако, при анализе межгенного спейсера *grfA-rrlB* выявляются две эволюционные линии *B. afzelii* – Vs461 и NT28 - что является признаком наличия внутривидовой структурированности этих боррелий. Низкий полиморфизм

может быть признаком сильного стабилизирующего отбора, действующего на популяции *B. afzelii*, причем экологический фактор этого отбора остается одним и тем же в любой точке ареала. Изоляты *B. garinii* отличаются широким разнообразием по структуре любого из изученных фрагментов генома. Внутривидовая структура *B. garinii* варьирует в зависимости от используемого для анализа фрагмента, что свидетельствует о многонаправленности эволюционных процессов, происходящих при адаптации *B. garinii* к локальным экосистемам. Для *B. afzelii* и *B. garinii*, циркулирующих в Восточной Сибири и Монголии, наиболее близкородственные изоляты обитают в сопредельных регионах Российской Федерации – на Дальнем Востоке (в Хабаровском крае) и в Западной Сибири. Скорее всего, это означает, что в регионе циркулирует единая популяция возбудителей КБ, причем связи ее с другими природными очагами ограничены.

4.3. Разнообразие бактерий пор. *Rickettsiales*

Анализ гена 16S rRNA микроорганизмов пор. *Rickettsiales* выявил, что иксодовые клещи на территории Монголии и Прибайкалья инфицированы, по меньшей мере, пятью видами этих микроорганизмов – *R. sibirica*, *R. raoultii*, *E. muris*, “*Montezuma*” и *Candidatus R. tarasevichiae*. Инфицированность иксодовых клещей этими микроорганизмами очень высока – порядка 70 % степных клещей и порядка 30 % таежных клещей инфицированы риккетсиями и/или анаплазмами и эрлихиями (табл. 3). Риккетсиями *Candidatus R. tarasevichiae* заражено до 26 % *I. persulcatus*. Реже встречаются *Ehrlichia muris* (5 %) и риккетсиеподобный микроорганизм «*Montezuma*» (единичная находка). Анализ гена *gOmpA* риккетсий позволил идентифицировать две внутривидовые группы *R. raoultii* – DnS14 и DnS28 и описать их распространенность среди клещей и встречаемость у заболевших людей в Прибайкалье и Монголии. При этом филогеографическая структура *Rickettsiales* на протяжении всего ареала оказалась униформной по обоим генам. Кроме ожидаемых бактерий порядка *Rickettsiales*, по нуклеотидным последовательностям гена 16S rRNA обнаружена инфицированность таежных клещей микроорганизмами не относящимися к альфа-1-протеобактериям. Наиболее близкородственными им оказались гама- и бета-протеобактерии родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*.

Глава 5. Влияние точечных замен в геноме ВКЭ на биологические свойства вируса

Расширение объемов исследования ВКЭ привело к тому, что в последние 20 лет был выявлен значительный полиморфизм биологических свойств природных изолятов ВКЭ. В частности, была описана группа ВКЭ (более 40 штаммов) отличающихся неспособностью агглютинировать гусиные эритроциты в широких пределах кислотности от pH = 5,75 до pH = 7.

Кроме этого, данная группа штаммов, получившая название «антиген-дефектных», отличалась от типовых штаммов ВКЭ мелкобляшечным фенотипом в культуре клеток СПЭВ

(~1мм), пониженной комплемент-фиксирующей активностью и относительно высокой резистентностью к антителам сывороток крови больных КЭ (Погодина В. В. и др., 1992).

Таблица 3. Зараженность клещей риккетсиями, анаплазмами и эрлихиями по данным ПЦР-анализа

Регион, вид клещей	Обнаружен ген rOmpA <i>Rickettsia</i> sp. (%)	Обнаружен ген 16S rRNA <i>Ehrlichia</i> sp. и/или <i>Anaplasma</i> sp. (%)
Иркутская область		
<i>Dermacentor nuttalli</i> (n=62)	75 %	0
<i>Dermacentor silvarum</i> (n=92)	64 %	0
<i>I. persulcatus</i> (n=261)	26 %	13,3 %
Монголия		
<i>Dermacentor nuttalli</i> (n=142)	78 %	2,1 %
<i>I. persulcatus</i> (n=146)	46 %	43 %

Для установления генетических механизмов, обеспечивающих такие биологические свойства, нами были исследованы 4 штамма данной группы, изолированные в Ярославской области - Яр 71, Яр 114, Яр 46-2 и Яр 48 (далее Яр-ВКЭ, табл. 4). Поскольку гемагглютинирующая активность ВКЭ определяется структурой вириона и, прежде всего, белка Е, были проанализированы нуклеотидные последовательности генов С, ргМ и Е этих изолятов. Оказалось, что все Яр-ВКЭ, как и контрольный вирус «Васильченко», относятся к СИБ субтипу ВКЭ. Общая топология древа соответствует ранее опубликованным результатам (Esker M., 1999; Hayasaka D, 2001 и др.). При этом Яр-ВКЭ с высокой степенью достоверности (бутстреп-поддержка соответствующих узлов 94-100%) относятся к «Балтийской» эволюционной линии ВКЭ (Golovljova I., 2008). В структурной части генома обнаружена только одна общая мутация, свойственная группе Яр-ВКЭ: в позиции 175 белка Е все Яр-ВКЭ имеют аспарагин, тогда как у всех остальных ВКЭ данная позиция высококонсервативна и содержит треонин. Мы ввели мутацию T175N в инфекционный клон штамма Васильченко (pGGVs). Оказалось, что мутантный ВКЭ IC-T175N агглютинирует гусиные эритроциты в титрах до 1:640, что сопоставимо с титрами гемагглютининов в контрольных ВКЭ (Табл. 4). Исходя из этого, было сделано предположение, что «антиген-дефектный» фенотип каждого Яр-ВКЭ определяется индивидуальным генетическим полиморфизмом. Углубленный анализ элайнмента выявил 3 неконсервативные мутации в белке Е, каждая из которых уникальна для одного из Яр-ВКЭ. Так, изолят Яр 46-2 содержит замену аспарагиновой кислоты на глицин в позиции 67 (D67G), Яр 71 и Яр 114 – замену глутаминовой кислоты на глицин в позиции 122 (E122G) а Яр 48 – замену аспарагиновой кислоты на аланин в позиции 277 (D277A).

Таблица 4. Описание и биологические свойства штаммов группы Яр-ВКЭ, контрольных ВКЭ и инфекционных клонов, моделирующих мутации в белке Е ВКЭ

Изолят	Год изоляции	Источник изоляции	Пассажная история	Номер доступа GenBank	Титр гемагглютининов	Инфекционность ВКЭ в культуральной жидкости клеток СПЭВ через 72 часа, БОЕ/мл
Васильченко (Vs)	1961	Сыворотка крови пациента	Н.И.*	L40361	1:1280	2-8x10 ⁶
Яр 71	1999	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 7	EU444077	0	2-8x10 ⁶
Яр 114	2001	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 4 Мышь - 2	EU444078	0	2-8x10 ⁶
Яр 46-2	2001	Ткани мозга пациента	СПЭВ - 5 мышь - 2	EU444079	0	2-8x10 ⁶
Яр 48	2000	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 5	EU444080	0	2-8x10 ⁶
pGGVs	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1	-	1:640	2-8x10 ⁶
IC-D67G	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1	-	0	2-8x10 ⁶
IC-E122G	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1	-	0	2-8x10 ⁶
IC-D277A	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1	-	0	2-8x10 ⁶
IC-T175N	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1	-	1:640	2-8x10 ⁶

По сравнению с контрольными ВКЭ «Васильченко» и pGGVs, каждая из этих замен приводит к повышению заряда и гидрофобности белка Е, каждая из них экспонирована на поверхности вириона и картируется в наиболее выступающих петлях белка Е как в нативной димерной конформации, так и в тримерах белка Е в конформации пост-слияния мембран, (Mandl CW, 2001; Stiasny K., 2006; Kozlovskaya L.I., 2010). Также, мутация E122G была ранее ассоциирована с утратой гемагглютинирующей способности ВКЭ при адаптации к клещам *Hyalomma marginatum* (Romanova L.Iu., 2007). Соответствующие аминокислотные замены были введены в геном СИБ-ВКЭ и получены мутантные штаммы IC-D67G, IC-E122G и IC-D277A. Введение любой из трех мутаций приводит к полной утрате гемагглютинирующих свойств ВКЭ (табл. 4, рис. 4А). Все 3 мутантных вируса демонстрировали задержку в динамике репродукции в культуре клеток СПЭВ, наиболее заметную в течение первых 24 часов инфекции. Динамика репродукции мутанта D67G была лучше, чем у IC-E122G и IC-D277A, однако также отмечалось некоторое снижение репродуктивных характеристик по сравнению с контрольным вирусом pGGVs (рис. 4 В). Через 72 часа все ВКЭ достигали сопоставимых титров (Табл. 4). Все исходные Яр-ВКЭ в культуре клеток СПЭВ образовывали мелкие бляшки диаметром 0,9-1 мм, в то время как контрольный вирус pGGVs образовывал бляшки диаметром 3,0 ± 0,2 мм. Однако лишь 2 созданных мутанта - IC-E122G и IC-D277A - имели мелкобляшечный фенотип (1,3 ± 0,2 и 1,5 ± 0,3 мм соответственно), а размер бляшек IC-D67G не отличался от контрольного

вируса pGGVs ($3,0 \pm 0,3$ мм) (Рис. 4 С). Все мутантные вирусы оказывали цитопатическое действие на клетки СПЭВ, при этом скорость и степень ЦПД достоверно не отличались от ЦПД контрольного вируса pGGVs даже при высокой множественности инфекции (10 БОЕ на каждую клетку). Все 3 мутантных вируса обладали пониженной нейроинвазивностью для белых мышей и вызывали гибель 15-30 % животных (рис. 4 D).

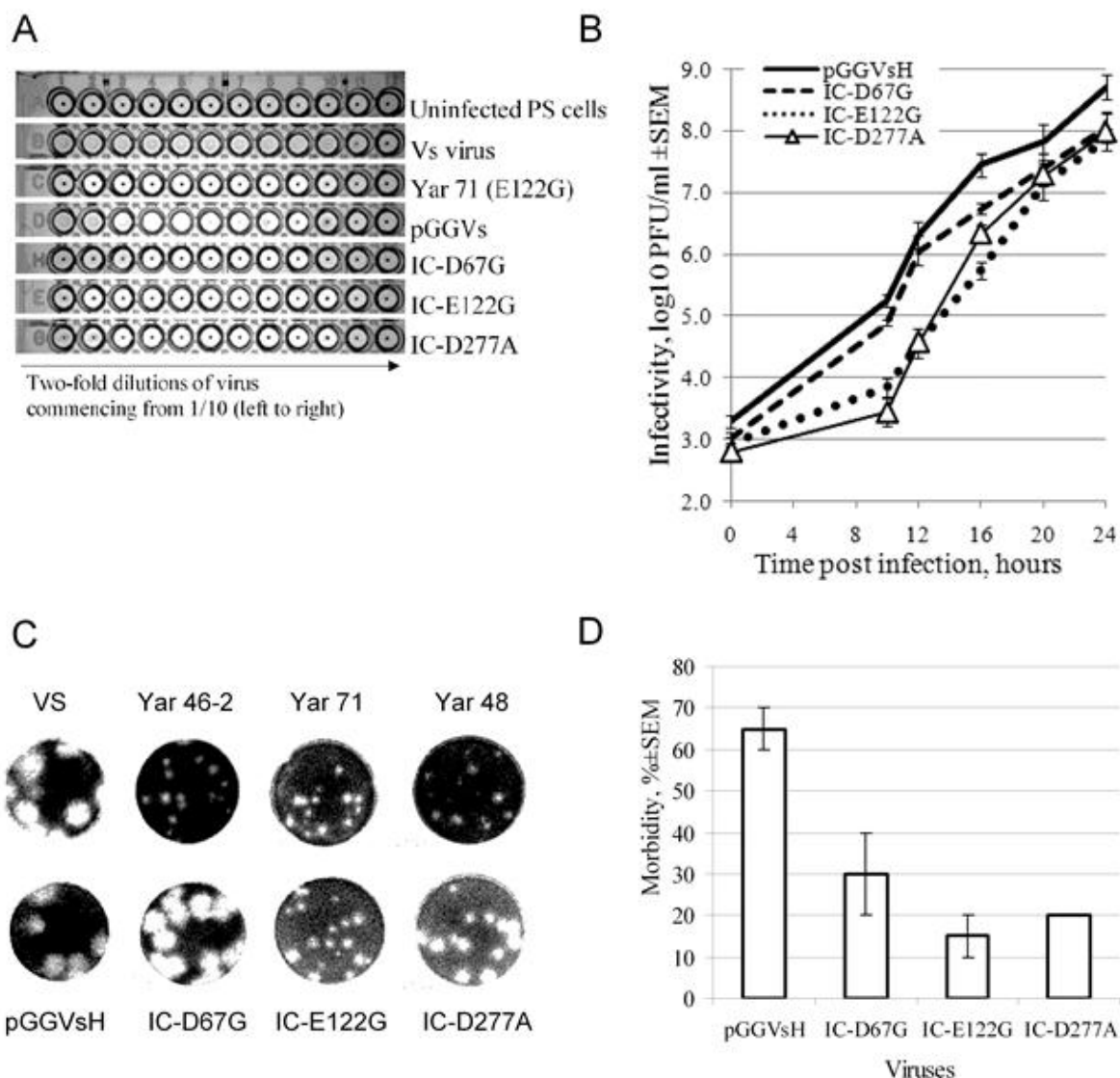


Рисунок 4. А) Мутации D67G, E122G и D277A в белке Е полностью ингибируют способность ВКЭ агглютинировать эритроциты гуся (рН = 6,2 $1-4 \times 10^7$ БОЕ на лунку). В) Мутации D67G, E122G и D277A вызывают задержку репликации ВКЭ в культуре клеток СПЭВ на ранних стадиях инфекции. С) Морфология бляшек в монослое клеток СПЭВ для контрольных ВКЭ (нативный Vs и инфекционный клон pGGVs), нативных Яр-ВКЭ (Yar 46-2, Yar 71 и Yar 48) и ВКЭ, содержащих мутации D67G, E122G и D277A. D) Вирулентность мутантных ВКЭ для лабораторных белых мышей при интраперитонеальном заражении (2000 БОЕ на мышшь).

Для оценки влияния точечных мутаций на циркуляцию ВКЭ среди иксодовых клещей было проведено два эксперимента. В первом из них было выяснено, что динамика репродукции мутантных ВКЭ IC-E122G и IC-D277A в голодных клещах не отличалась от репродукции репродукция контрольного вируса pGGVs, в то время как вирус IC-D67G обладал

пониженными репродуктивными характеристиками (рис. 5 А). После 3 дней питания концентрация ВКЭ в слюнных железах *I. ricinus* во всех случаях резко возросла. Однако, если титр контрольного вируса рGGVs увеличивался в 10 раз, то титры IC-D67G и IC-D277A вырастали в 300 раз, а титр IC-E122G увеличивался в 1000 раз.

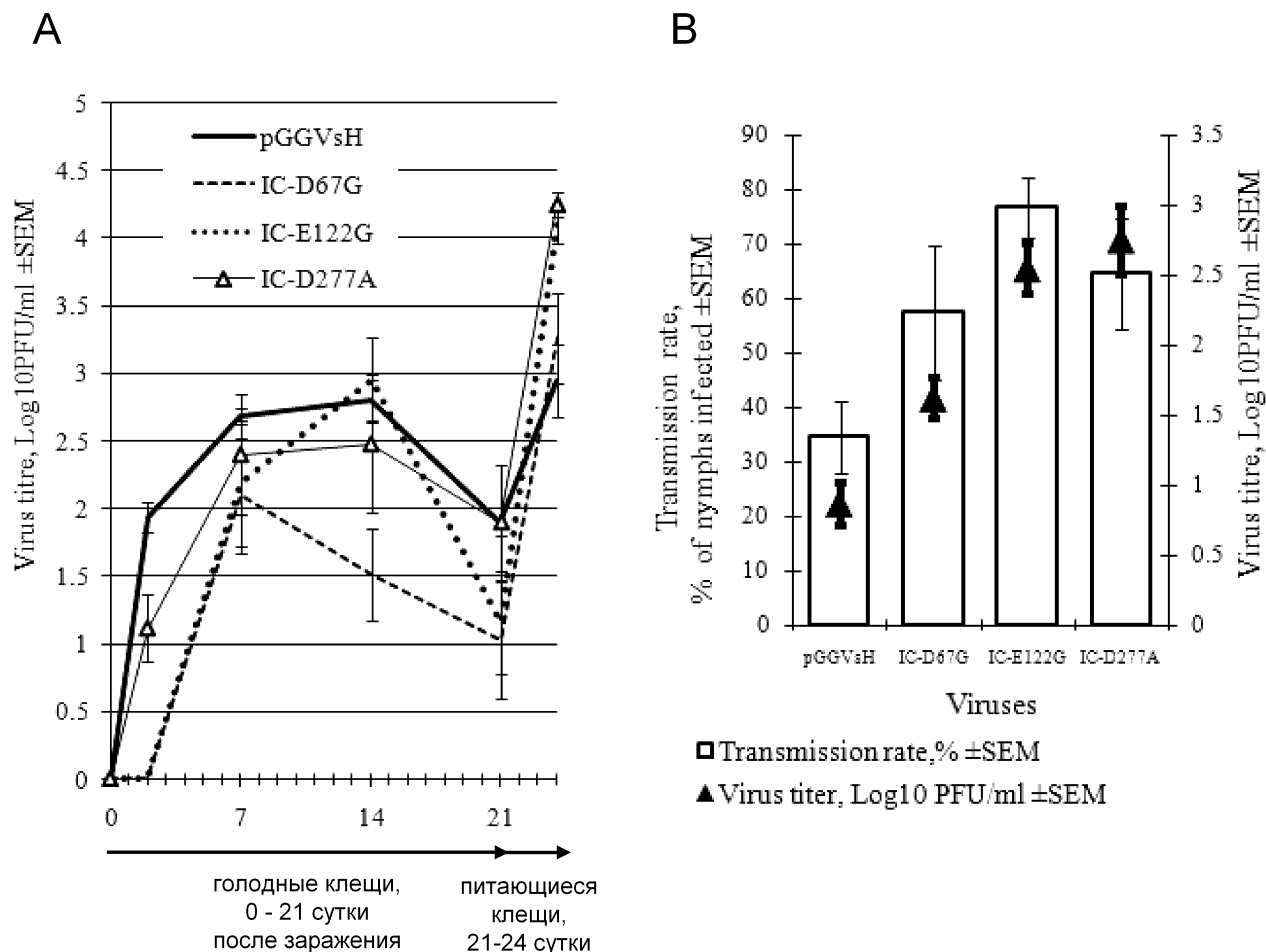


Рисунок 5. Влияние мутаций D67G, E122G и D277A на репродукцию ВКЭ в клещах *I. ricinus* **А)** Репродукция мутантных ВКЭ в слюнных железах голодных (2, 7, 14 и 21 день после заражения) и напитавшихся (24 день) самок *I. ricinus*. **Б)** Эффективность неvirемической трансмиссии мутантных ВКЭ (% , белые прямоугольники) в сравнении со средним титром ВКЭ в инфицированных нимфах (черные треугольники). Планки погрешностей отображают стандартную ошибку средних значений.

Достоверные различия итоговых титров ВКЭ в слюнных железах клещей (t-критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$) были выявлены между вирусами E122G и IC-D277A, которые достигали концентрации 4,3 lg БОЕ/мл и вирусами рGGVs и IC-D67G, титры которых варьировали от 2,6 до 3,6 lg БОЕ/мл. Во втором эксперименте была оценена эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ от зараженных самок *I. ricinus* к незараженным нимфам. Оказалось, что все 3 мутации существенно повышали способность ВКЭ к неvirемической трансмиссии в клещах *I. ricinus*. Кроме того, концентрация инфекционного вируса в нимфах клещей, зараженных мутантными ВКЭ, также были повышены по сравнению с контрольным рGGVs (рис. 5 В).

Корреляции между титрами ВКЭ в самках на 21 или 24 день после заражения и эффективностью неvirемической трансмиссии не выявлено (рис. 5).

Чтобы установить распространенность исследуемых вариантов ВКЭ в природе и оценить их эволюционную, экологическую и эпидемиологическую роль, были проанализированы 337 полноразмерных нуклеотидных последовательностей белка Е ВКЭ, опубликованных в GenBank. В анализе учитывали замены заряженных аминокислот гидрофобными или нейтральными аминокислотами в позициях, экспонированных на поверхности белка Е и\или вириона ВКЭ. В целом, такие мутации были обнаружены у 23 изолятов (6,8 %) включая Яр-ВКЭ, исследованные в данной работе. Штаммы с потенциально повышенным зарядом и\или гидрофобностью поверхности белка Е выявлены примерно в равных пропорциях среди всех трех субтипов (т.е., среди ДВ-ВКЭ, СИБ-ВКЭ, и Е-ВКЭ); вирусы с подобными мутациями были изолированы в различных географических регионах от широкого спектра хозяев, включая иксодовых клещей, мышевидных грызунов и больных людей. Мутации были локализованы в позициях 67, 84, 122, 155, 170 и 203. Наиболее распространенными оказались мутации в позиции 67, которые обнаружены в 11 изолятах (47,8% от общего числа обнаруженных мутантов). В большинстве случаев мутанты с заменами в позиции 67 были изолированы от больных людей либо от мышевидных грызунов. Таким образом, подобные мутации сравнительно редко встречаются в природе, по всей видимости, быстро элиминируются из естественных популяций вируса и не оказывают существенного влияния на эволюцию ВКЭ. Можно предположить, что подобные варианты ВКЭ могут играть определенную роль в патологии КЭ, поскольку с одной стороны, ассоциированы с улучшением репродуктивных свойств ВКЭ в млекопитающих (D67G), а с другой стороны, способствуют более эффективной трансмиссии ВКЭ (E122G, D277A) в природных сообществах, что вероятно позволяет таким вирусам спорадически инфицировать неспецифичных клещей-переносчиков.

В итоге, установлено, что такие биологические свойства ВКЭ как гемагглютинирующая активность, способность к репродукции в клетках млекопитающих и иксодовых клещей, эффективность неvirемической трансмиссии зависят от свойств белка Е и могут изменяться вследствие несистематических, спонтанных мутаций. Эти мутации локализуются в экспонированных на поверхности вириона локусах белка Е, приводят к увеличению заряда и\или гидрофобности поверхности вириона и не совпадают с систематическими маркерными аминокислотными заменами, отражающими адаптацию ВКЭ к специфическому спектру хозяев.

Глава 6. Генетические детерминанты эффективности циркуляции ВКЭ между зараженными и незараженными клещами специфичного для Е-ВКЭ вида *I. ricinus*

Сначала проведено сравнение эффективности репродукции и циркуляции среди *I. ricinus* двух типовых штаммов СИБ-ВКЭ (Васильченко) и Е-ВКЭ (Нург wt). В среднем, ЭТ штамма Нург составляла 65 %, тогда как у штамма Васильченко (Vs wt) этот показатель варьировал от 5 до 15 % (рис. 6). Клещи *I. ricinus* использованные в этом эксперименте являются специфичными переносчиками для Е-ВКЭ ВКЭ, поэтому на следующем этапе было решено выяснить, какие элементы генома ВКЭ отвечают за оптимизацию ЭТ штамма Нург между *I. ricinus*.

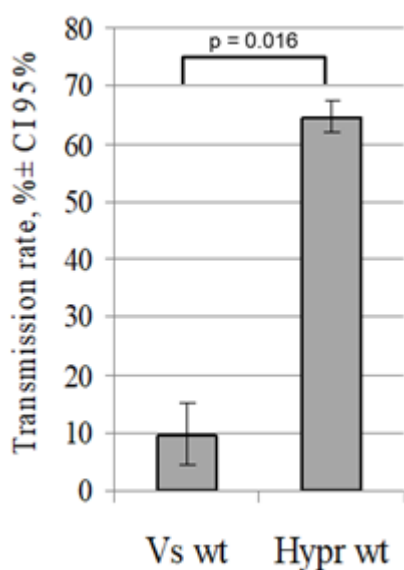


Рисунок 6. Сравнение эффективности неvirемической трансмиссии СИБ-ВКЭ («Vs wt») и Е-ВКЭ («Нург wt») между клещами *I. ricinus*. По оси ординат отображена доля нимф заразившихся соответствующим штаммом ВКЭ в процессе совместного питания с двумя самками *I. ricinus* искусственно инфицированными 500БОЕ ВКЭ каждая. Планки погрешностей отображают 95% доверительный интервал. Статистическую значимость наблюдаемых различий оценивали по U-критерию Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Для этого мы заменили гены в геноме инфекционного клона штамма Нург на гомологичные гены инфекционного клона штамма Vs и наоборот (рис. 7). У всех полученных контрольных и рекомбинантных штаммов для подтверждения их идентичности и исключения неспецифичных точечных мутаций была расшифрована первичная нуклеотидная последовательность (GenBank KP716971 - KP716978). Нуклеотидные последовательности соответствовали ожидаемым моделям, случайных аминокислотных замен выявлено не было. Полученные рекомбинантные ВКЭ были исследованы в отношении их репродуктивной способности в культуре клеток млекопитающих и в клещах *I. ricinus* на разных стадиях развития, вирулентности для лабораторных мышей и эффективности неvirемической трансмиссии между клещами *I. ricinus*. В культуре клеток СПЭВ, все рекомбинантные штаммы с одинаковой эффективностью размножались и не уступали контрольным штаммам ВКЭ ни в скорости репродукции в первые 24 часа после заражения, ни в итоговой концентрации инфекционных частиц через трое суток инфекции. Единственным исключением оказался

рекомбинантный штамм Нурр [Vs str], инфекционность которого была понижена на 0,5-1 lg БОЕ/мл. Все контрольные и рекомбинантные вирусы были стабильны при стандартных условиях проведения экспериментов, без снижения инфекционности переносили замораживание-оттаивание и повышение температуры до 40°C в течение 1-1,5 ч., что достаточно для проведения технических манипуляций.

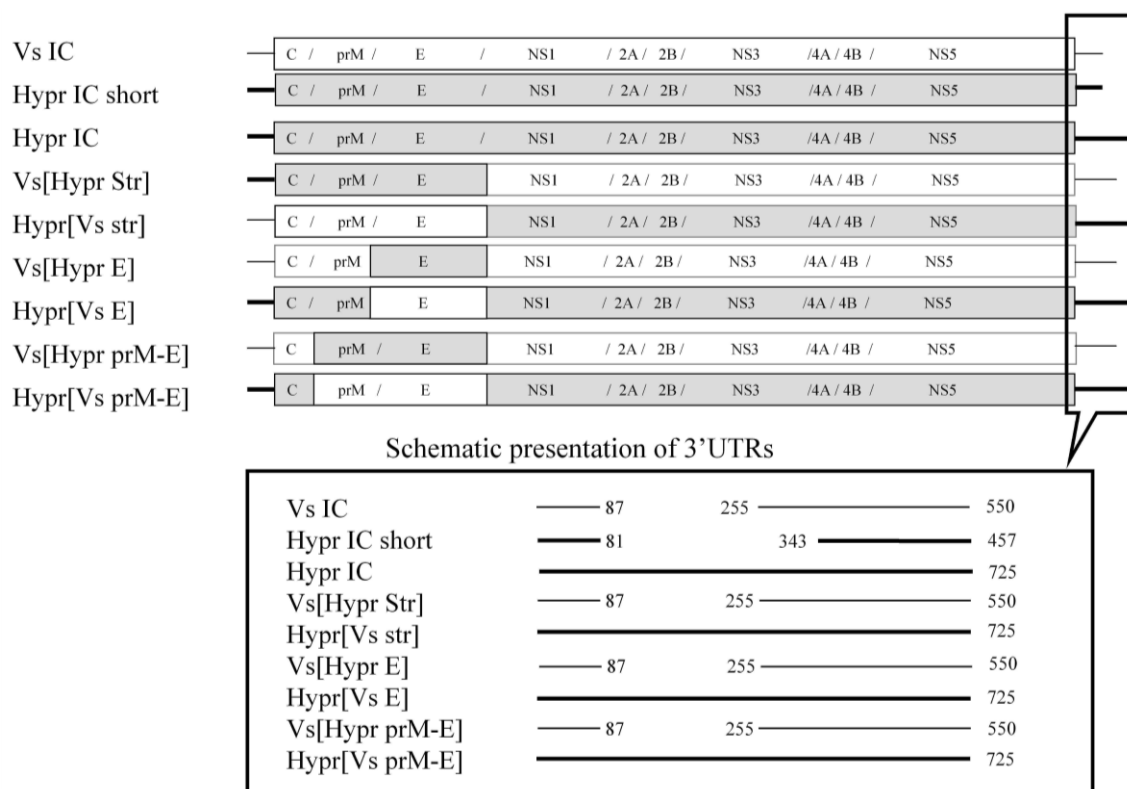


Рисунок 7. Схематическое изображение рекомбинантных ВКЭ. Кодированная часть генома и отдельные гены ВКЭ Нурр обозначены серыми прямоугольниками с соответствующими обозначениями генов (С - капсидного белка, prM – мембранного, E – оболочечного, Ns1, Ns2a/b, Ns3, Ns4 a/b, Ns5 – гены неструктурных белков). Кодированная часть генома и отдельные гены ВКЭ Васильченко обозначены белыми прямоугольниками с соответствующими обозначениями генов. Тонкие линии по краям прямоугольников обозначают нетранслируемые регионы. В нижней выноске дана детализация структуры 3' нетранслируемых регионов (3'НТР) рекомбинантных ВКЭ и инфекционных клонов, цифрами обозначены делеции в 3'НТР в нумерации генома «Васильченко» (GenBank # L40361).

Для контрольного штамма Vs IC через 5 дней инфекции характерны мутные бляшки с размытыми краями диаметром 5-6 мм, тогда как Нурр IC продуцирует прозрачные бляшки диаметром 3-4 мм. Рекомбинантные штаммы ВКЭ на основе генома СИБ-ВКЭ Vs [Нурр E] и Vs [Нурр prM-E] формировали бляшки Vs-типа, т.е. крупные и мутные. Внедрение дополнительно гена белка С от Нурр IC в геном Vs IC приводило к уменьшению диаметра бляшек, однако они оставались мутными подобно бляшкам исходного штамма Vs IC. Рекомбинантные штаммы Нурр [Vs E], Нурр [Vs prM-E] и Нурр [Vs str] формировали мелкие и прозрачные бляшки, характерные для исходного штамма Нурр IC. В отличие от Vs [Нурр str], присутствие гена С из

генома СИБ-ВКЭ Vs IC не оказывало существенного влияния на морфологию рекомбинантного штамма Нург [Vs str] – формируемые бляшки не отличались от двух других рекомбинантов на основе генома Е-ВКЭ ни по размеру, ни по степени разрушения монослоя. Таким образом, морфология бляшек ВКЭ в культуре клеток СПЭВ в значительной мере определяется свойствами неструктурной части генома вируса.

При оценке ЦПД контрольных штаммов в течение 96 ч. инфекции было установлено, что при заражении Нург IC к этому времени остается $27,1 \pm 5,3$ % жизнеспособных клеток. При инфицировании Vs IC в идентичных условиях показатели выживаемости клеток СПЭВ были существенно выше и составляли $49,5 \pm 3,2$ %. Все рекомбинантные штаммы, сконструированные на основе генома Нург IC, т.е. Нург [Vs E], Нург [Vs prM-E] и Нург [Vs str], разрушали по меньшей 70% клеток СПЭВ в течение 96 ч. инфекции. Это полностью совпадало с показателями исходного вируса Нург IC (рис. 12). ЦПД всех рекомбинантных ВКЭ на основе генома СИБ-ВКЭ было сопоставимо с действием контрольного штамма Vs IC. В отличие от вирусов на основе Нург IC, наблюдался более широкий полиморфизм выживаемости клеток СПЭВ поскольку количество погибших клеток варьировало от 30 до 55 % в зависимости от генетической модификации структурной части генома вируса (рис. 8). Достоверные различия наблюдались только между группами вирусов на основе генома Нург IC и вирусов на основе генома Vs ($p \leq 0,05$), различия между вирусами внутри каждой группы были недостоверны. Таким образом, ЦПД ВКЭ в культуре клеток СПЭВ практически полностью определяется свойствами комплекса неструктурных генов.

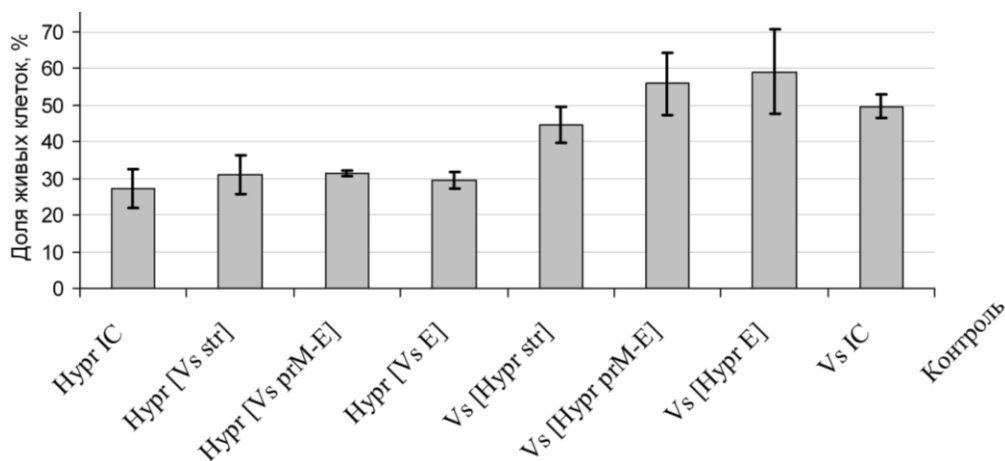


Рисунок 8. Цитопатическое действие рекомбинантных ВКЭ на культуру клеток СПЭВ. Каждый тест проводился в 4 независимых повторах, на диаграмме отражены средние значения с указанием 95% доверительного интервала.

Наблюдались высокодостоверные различия ($p < 0,01$) в ЭТ между контрольными штаммами Нург IC (62,5 %) и Vs IC (13 %), что соответствовало ранее наблюдаемым различиям в ЭТ штаммов Vs и Нург дикого типа. Наиболее замечательным результатом оказалась повышенная до 84 % ЭТ рекомбинантного ВКЭ Vs [Нург str]. Этот показатель был существенно

выше, чем ЭТ любого другого ВКЭ в нашем наборе, включая контрольный E-ВКЭ Нурр IC. Характерно, что комплементарный штамм Нурр [Vs str] полностью потерял способность передаваться между клещами *I. ricinus* (рис. 9).

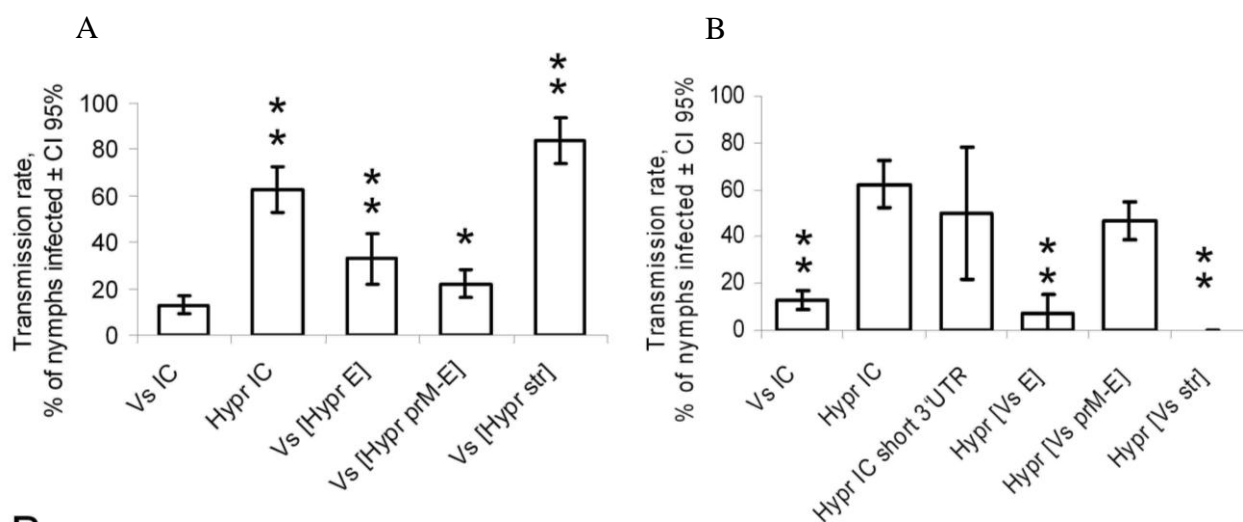


Рисунок 9. Эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ между клещами *I. ricinus*. Приведены показатели ЭТ (%) **А**) для рекомбинантных ВКЭ на основе генома Vs IC; **В**) для рекомбинантных ВКЭ на основе генома Нурр IC. Планки погрешностей отображают 95 % доверительный интервал. Статистически достоверные различия ($p < 0,01$, тест Mann-Whitney) между рекомбинантными и контрольными ВКЭ обозначены двумя звездочками, высоко достоверные различия ($p < 0,05$) обозначены одной звездочкой.

Очевидно, что эффективная несистемная трансмиссия ВКЭ между клещами *I. ricinus* полностью определяется свойствами структурных белков С, рrМ и Е. При замене гена Е у Нурр IC гомологичным геном Vs IC происходит существенное снижение ЭТ с 62,5 % до 7 % (Нурр [Vs E], рис. 9), что указывает на критическую роль оболочечного белка Е в адаптации ВКЭ к передаче между клещами *I. ricinus*. Замена рrМ-Е на неспецифичный фрагмент также привела к снижению ЭТ, хотя и в гораздо меньших масштабах – до 47 % (рис. 9 В). Вероятнее всего, это обусловлено биологической ролью белка рrМ. Он является шапероном для корректного складывания белка Е внутри клетки хозяина и обеспечивает эффективное формирование оболочки вириона (Stadler К. и др., 1997). Наличие соответствующих друг другу белков рrМ и Е может существенно увеличить эффективность репликации вируса даже в том случае если эти белки не оптимально адаптированы к организму клеща-хозяина. Рекомбинантные СИБ-ВКЭ на основе генома Vs IC и содержащие ген Е (Vs [Нурр E]) или рrМ-Е (Vs [Нурр рrМ-Е]) от E-ВКЭ передавались между клещами *I. ricinus* существенно лучше, чем родительский вирус Vs IC. И хотя отличия не были столь значительны, как при модификации Нурр IC отдельными структурными генами Vs IC, они были высоко достоверны (рис. 9А). Совокупное увеличение ЭТ, вызванное заменой Е и рrМ в Vs IC на гомологичные гены Нурр IC составило порядка 10%, тогда как замена фрагмента генома 5'НТР-С-рrМ-Е привела приблизительно к 80 % увеличению способности Vs IC циркулировать среди клещей *I. ricinus*. Можно сделать вывод, что либо

фрагмент 5'НТР-С обеспечивает какой-то критический этап неvirемической передачи ВКЭ, либо для эффективной трансмиссии необходима структурная целостность вириона, состоящего из максимально адаптированных к организму клеща элементов – белков С, М и Е.

В слюнных железах клещей концентрация инфекционного вируса достоверно отличалась у контрольных штаммов Vs IC (~ 3,5 lg БОЕ/мл) и Нург IC (~ 4,5 lg БОЕ/мл) (рис. 10). Наибольший инфекционный титр в самках *I. ricinus* был отмечен для рекомбинантного штамма Vs [Нург str] (~ 5 lg БОЕ/мл.), что хорошо согласовывалось с высокой ЭТ этого вируса. Введение E и prM-E генов от Нург IC в геном Vs IC не привело к достоверному увеличению титров ВКЭ в слюнных железах клещей, что согласуется с данными о малом увеличении ЭТ для этих вирусов по сравнению с контрольным Vs IC (рис. 10 А).

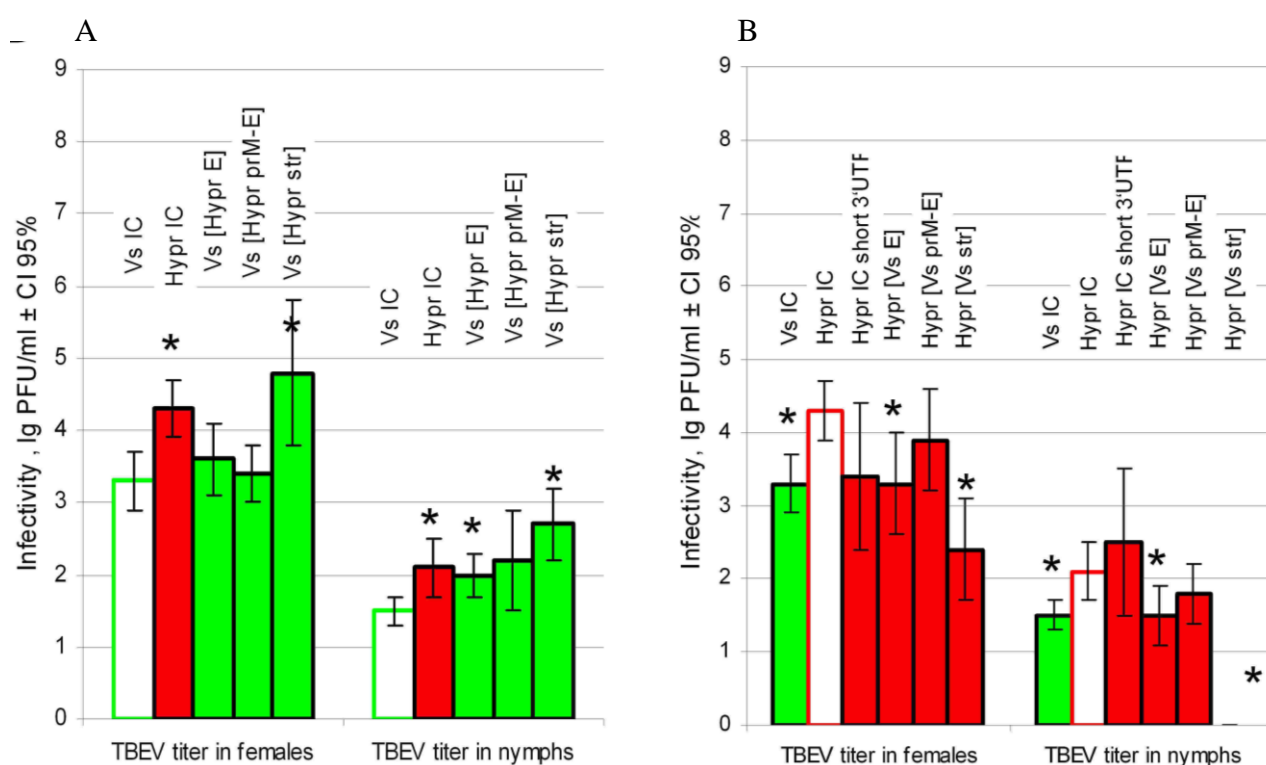


Рисунок 10. Концентрация инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок и в нимфах *I. ricinus*. На диаграмме показаны средние значения, планки погрешностей отображают 95 % доверительный интервал. **А)** рекомбинантные штаммы ВКЭ на основе генома Vs IC; **В)** рекомбинантные штаммы ВКЭ на основе генома Нург IC. Штаммы, содержащие неструктурные гены Нург, а также контрольный штамм Нург IC обозначены красными блоками. Штаммы, содержащие неструктурные гены Vs, а также контрольный штамм Vs IC обозначены зелеными блоками. Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, высоко достоверные различия ($p < 0,05$) между контрольным и рекомбинантными вирусами обозначены звездочкой.

Замена региона 5'НТР-С-prM-E в Нург IC на гомологичный фрагмент генома Vs IC привело примерно к стократному снижению способности рекомбинантного штамма Нург [Vs str] размножаться в слюнных железах клещей *I. ricinus*. Так, средний титр Нург IC составлял ~ 4,5 lg БОЕ/мл, тогда как инфекционность рекомбинантного штамма Нург [Vs str] достигала порядка 2,5 lg БОЕ/мл (рис. 10 В). Учитывая, что инфицирующая доза ВКЭ при заражении

самок составляла 2,7 lg БОЕ/мл (500 БОЕ), можно сделать вывод о том, что способность Нург [Vs str] к репродукции в самках *I. ricinus* крайне ограничена. Замена отдельных генов E и rgM-E в Нург IC соответствующими генами Vs IC приводила к некоторому снижению концентрации инфекционного вируса в слюнных железах, но в гораздо меньшей степени, чем модификация полного региона 5'НТР-С-rgM-E. Из этих двух штаммов, статистически значимые различия ($p < 0,05$) наблюдались только между Нург IC (~ 4,5 lg БОЕ/мл) и Нург [Vs E] (~ 3,5 БОЕ/мл).

Все рекомбинантные вирусы были способны инфицировать лабораторных белых мышей через укус инфицированных клещей и обладали выраженными патогенными свойствами. Различия в патогенности рекомбинантных штаммов ВКЭ были обусловлены введенными нами изменениями в геноме вируса и отражали дифференциальное взаимодействие разных вариантов ВКЭ с организмом теплокровных хозяев, а не были следствием более высокой заражающей дозы вируса благодаря более эффективной репликации ВКЭ в слюнных железах клещей.

Для того чтобы установить, чем обусловлены наблюдаемые изменения в ЭТ, был использован регрессионный и корреляционный анализ. При ранжировании вирусов в порядке уменьшения ЭТ, прослеживаются тесные ассоциации между ЭТ, титром ВКЭ в слюнных железах клещей и структурой генома ВКЭ (рис. 11).

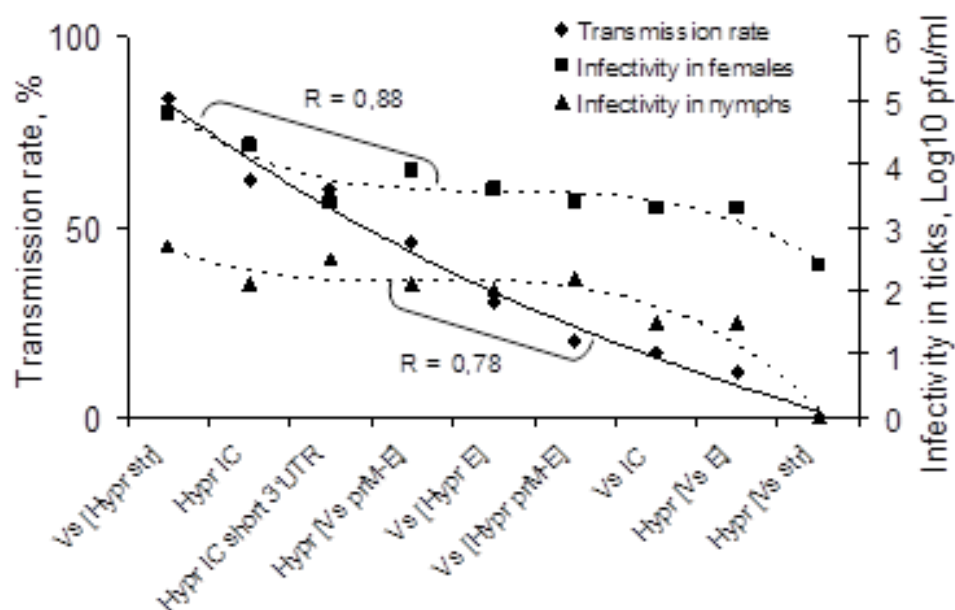


Рисунок 11. Корреляция между ЭТ разных рекомбинантных штаммов ВКЭ и их репродукцией в слюнных железах различных жизненных стадий *I. ricinus*. Линии тренда рассчитаны полиномиальным методом, Коэффициенты корреляции между ЭТ (сплошная линия) и титрами вируса в слюнных железах нимф и самок клещей (пунктирные линии) обозначены скобками с указанием значений коэффициента корреляции R.

Обнаружена сильная корреляция между титром ВКЭ в самках и ЭТ ($r = 0.88$), в нимфах корреляция титра и ЭТ также была сильной, хотя и менее надежной ($r = 0.78$). В целом, картина изменения инфекционности ВКЭ была очень схожей у нимф и самок *I. ricinus*, что может быть

интерпретировано как общее снижение адаптированности вируса к беспозвоночному хозяину в зависимости от неспецифичных замен фрагментов генома вируса (рис. 11). Далее были рассчитаны генетические дистанции между исследуемыми вирусами как число аминокислотных замен на сайт по сравнению с последовательностью исходного штамма Vs IC. В анализ были взяты только структурные гены. После этого генетические дистанции были сопоставлены с ЭТ соответствующих вирусов (рис 12). Линейная регрессия указывает на сильную корреляцию между этими рядами данных ($r = 0.75$).

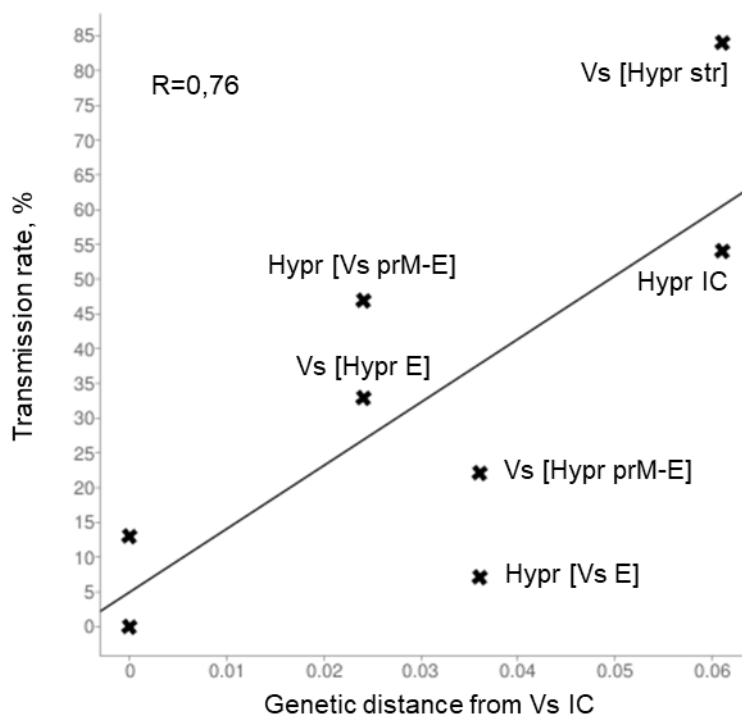


Рисунок 12. Взаимосвязь между ЭТ и структурой полипротеина ВКЭ. Аминокислотные различия в регионе С-prM-E полипротеина контрольных и рекомбинантных штаммов ВКЭ отображены на оси абсцисс как количество аминокислотных замен на сайт по сравнению с последовательностью штамма Vs IC. Показатели ЭТ отображены по оси ординат. Линейная регрессия рассчитана по формуле $[Y = 914.53 * X + 4.77]$ и отображена сплошной линией ($R^2 = 0.58$). В верхнем левом углу графика указан коэффициент корреляции Пирсона ($r = 0,76$).

Замена комплекса структурных генов ВКЭ приводит к полной инверсии видовой специфичности неvirемической трансмиссии ВКЭ между клещами *I. ricinus*. Кроме того, с высокой долей вероятности, белок С является критически важным для осуществления эффективной трансмиссии ВКЭ в специфичном виде клещей. В итоге, корреляционный анализ показал, что эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ во многом определяется титрами, которые вирус способен достичь в слюнных железах клещей-доноров. Сильная корреляция между аминокислотной последовательностью комплекса генов С-prM-E указывает на то, что структурные гены являются основной генетической детерминантой эффективной циркуляции ВКЭ между клещами.

Глава 7. Роль генетического разнообразия ВКЭ в обеспечении устойчивой циркуляции вируса в природе

Сравнительно недавно для оценки устойчивости циркуляции патогенов в популяции хозяев была разработана концепция репродуктивного числа инфекции R_0 (“basic reproduction number” или “basic reproductive ratio”). По определению, R_0 — это ожидаемое среднее количество вторичных случаев заражения, производимое одним инфицированным индивидуумом за время его жизни. В том случае, когда $R_0 < 1$, каждый инфицированный индивидуум вызывает в среднем менее одного нового случая заражения и инфекция элиминируется из популяции хозяев. В том случае, когда $R_0 > 1$, патоген способен к устойчивой циркуляции и распространению в восприимчивой популяции (Heffernan J.M., et al. 2005; Diekmann O., et al.; Hartemink NA, et al., 2008). Для того чтобы оценить влияние генетического разнообразия на устойчивость циркуляции ВКЭ в системе *I. ricinus* – позвоночный хозяин, мы использовали вышеописанный подход и рассчитали значения R_0 для разных генетических форм ВКЭ: ВКЭ европейского субтипа (Hupr IC), сибирского субтипа (Vs IC) и промежуточных рекомбинантных вариантов (Hupr [Vs str], Vs [Hupr str], Hupr [Vs E], Hupr [Vs prM-E], Vs [Hupr E] и Vs [Hupr prM-E]). При этом для расчета элементов матрицы использовали биологические характеристики, полученные для каждого вируса в результате экспериментов. В модели использованы 20 биологических параметров, характеризующих клещей – переносчиков инфекций и 17 параметров, характеризующих ВКЭ. Вычисление значений этих элементов, а также детальное обоснование расчетов каждого элемента матрицы следующего поколения выполнено согласно N.A. Hartemink с соавт. (2008). Согласно модели максимально приближенной к естественной циркуляции ВКЭ, величина показателя R_0 с высокой достоверностью ($R^2 = 0,994$) находится в прямой линейной зависимости от эффективности неvirемической трансмиссии ВКЭ. При этом линейный тренд пересекает пороговое значение $R_0 = 1$ при эффективности неvirемической трансмиссии 27,1 % (рис. 13). Теоретически, это означает, что при снижении ЭТ до 27% и менее, E-ВКЭ не сможет устойчиво циркулировать в экосистеме даже в том случае, когда каждый клещ будет питаться на компетентном позвоночном хозяине. Можно предположить, что в природе эффективность неvirемической трансмиссии E-ВКЭ должна быть еще выше, поскольку остальные условия не будут столь оптимальны, как в эксперименте. С практической точки зрения, полученные результаты могут быть интерпретированы как теоретическое подтверждение потенциальной возможности контроля, и даже элиминации ВКЭ в природе.

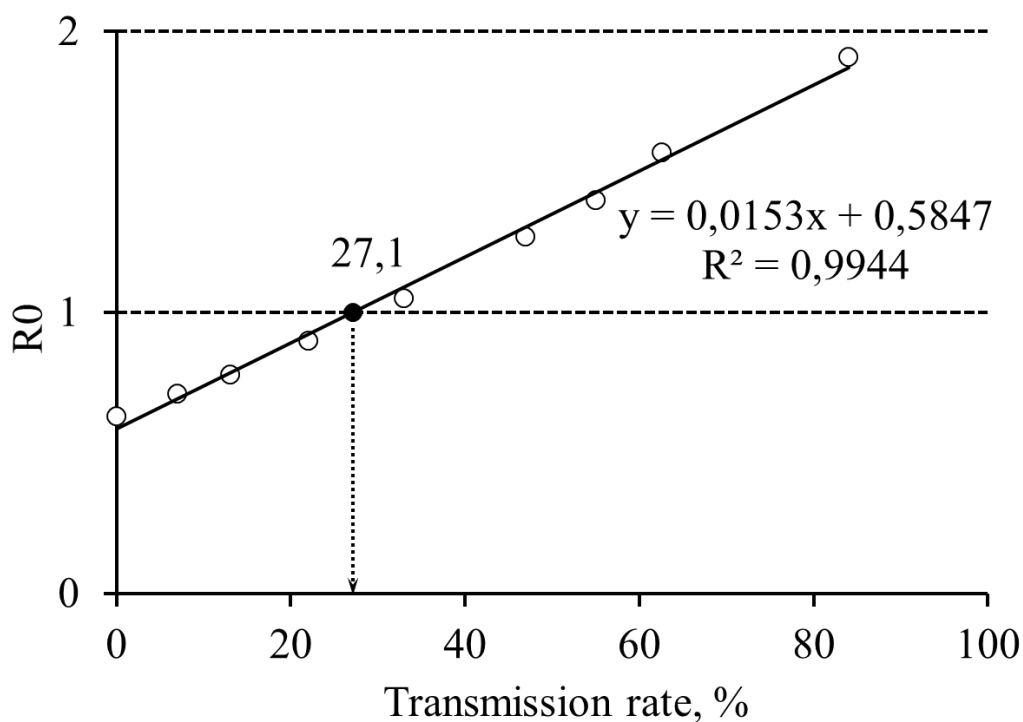


Рисунок 13. Зависимость R0 от эффективности неvirемической трансмиссии. А) на основе набора данных, максимально приближенного к естественной циркуляции ВКЭ по: (Hartemink N.A. и др., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что спектр видов «клещевых» микроорганизмов, обитающих в Восточной Сибири и Монголии и представляющих опасность для человека, практически идентичен и является типичным для биоценозов северной Евразии. Нами выявлена циркуляция вируса клещевого энцефалита, *Borrelia garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii* и микроорганизма «Montezuma». Подобный набор микроорганизмов определяется, по нашему мнению, видовым составом иксодовых клещей – основных переносчиков «клещевых» инфекций, который включает типичные для азиатских экосистем фоновые виды *I. persulcatus*, *D. nuttalli* и *D. silvarum*. Это означает, что только при изменении видового состава доминантных переносчиков, можно ожидать серьезных изменений в видовом составе клещевых микроорганизмов. Помимо известных возбудителей, в клещах *I. persulcatus* нами были выявлены ранее не описанные некультивируемые бактерии р. *Burkholderia sp.* и *Pseudomonas sp.* Значение этих микроорганизмов для здоровья человека неясно, однако любой из них имеет возможность инфицировать человека при укусе клеща.

Оказалось также, что для каждого из этих микроорганизмов характерно значительное внутривидовое разнообразие популяций выражающееся, прежде всего, в полиморфизме

первичной структуры геномов. При этом распространенность конкретных генетических вариантов клещевых микроорганизмов ограничена специфичной географической территорией и не зависит от административных или государственных границ. Детальный анализ генетического разнообразия ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato* и микроорганизмов порядка *Rickettsiales* показывают, что стабильное существование очагов этих инфекций обеспечивается за счет схожих механизмов формирования региональных популяций микроорганизмов, которые адаптированы к циркуляции в эндемичных видах позвоночных и беспозвоночных хозяев.

Так, на территории Восточной Сибири и Монголии циркулируют близкородственные популяции ВКЭ, в экосистемах бассейнов рек Селенга и Ангара идет постоянный обмен вирусными штаммами. При этом, по всей видимости, приток ВКЭ в регион Восточная Сибирь – Монголия из соседних регионов ограничен, а интродуцированные ВКЭ не формируют устойчивых популяций и не получают широкого распространения. Достаточно длительный период независимой эволюции наиболее характерных для Восточной Сибири и Монголии вирусов линий «Васильченко» СИБ-ВКЭ и «886-84» ДВ-ВКЭ позволяет предположить существование определенных механизмов экологической изоляции отдельных популяций ВКЭ в регионе. В Прибайкалье и Монголии циркулируют три вида *B. burgdorferi sensu lato* – *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. afzelii*. Анализ трех вариабельных фрагментов генома выявил что изоляты *B. afzelii* отличаются высокой степенью родства на всей протяженности ареала, однако формируется две эволюционные линии *B. afzelii* – Vs461 и NT28 - что является признаком наличия внутривидовой структурированности этих боррелий. Низкий внутривидовой полиморфизм может быть признаком сильного стабилизирующего отбора, действующего на популяции *B. afzelii*, причем экологический фактор этого отбора остается одним и тем же в любой точке ареала. Изоляты *B. garinii* отличаются широчайшим разнообразием по структуре любого из изученных фрагментов генома. При этом, внутривидовая структура *B. garinii* варьирует в зависимости от используемого для анализа фрагмента, что может быть свидетельством многовекторности эволюционных процессов, происходящих при адаптации *B. garinii* к локальным экосистемам. Для *B. afzelii* и *B. garinii*, циркулирующих в Восточной Сибири и Монголии, наиболее близкородственные изоляты обитают в сопредельных регионах Российской Федерации – на Дальнем Востоке (в Хабаровском крае) и в Западной Сибири. Скорее всего, это означает, что в регионе циркулирует единая популяция возбудителей КБ, причем связи ее с другими природными очагами ограничены.

Для выяснения факторов, ограничивающих стабильную циркуляцию клещевых микроорганизмов пределами специфичной экосистемы, проведены экспериментальные исследования того, как конкретные генетические модификации влияют на эффективность циркуляции клещевых инфекций. В качестве экспериментального микроорганизма нами был

выбран ВКЭ, а в качестве модели естественной циркуляции ВКЭ мы выбрали неvirемический путь трансмиссии между клещами *I. ricinus*. Выбранный нами подход позволил исследовать влияние структуры генома ВКЭ на циркуляцию между зараженными и незараженными клещами.

Было показано, что ВКЭ обладает двумя типами генетической изменчивости, приводящих к существенному изменению биологических свойств вируса. С одной стороны, при адаптации ВКЭ к организму нового хозяина, происходят точечные мутации в критических аминокислотных позициях белка Е ВКЭ. Эти мутации экспонированы на поверхности вириона и приводят к сдвигу заряда и/или гидрофобности поверхности вириона ВКЭ. При этом изучение известного генетического разнообразия ВКЭ показало, что изоляты с данным типом адаптивной изменчивости неспособны формировать устойчивые природные популяции и их доля в общей популяции ВКЭ не превышает 7%.

С другой стороны, эволюция ВКЭ привела к формированию устойчивых эволюционных линий вируса (например, субтипы ДВ-ВКЭ, СИБ-ВКЭ и Е-ВКЭ), адаптированных к определенным видам переносчиков, позвоночных хозяев, или, что более вероятно, целому эколого-фаунистическому комплексу. Биологические мотивы, а также экологические барьеры, поддерживающие разделение субтипов даже в ареале симпатрии остаются невыясненными. Результаты экспериментов показывают, что адаптация ВКЭ к организму разных видов клещей достигается за счет генетической изменчивости комплекса структурных генов С, рgМ и Е, хотя роль 5'НТР также не исключается. При этом устойчивая несистемная трансмиссия (один из основных путей циркуляции ВКЭ в природе) вируса возможна только при условии точного соответствия целого региона генома кодирующему 5'НТР, капсидный белок С, мембранный белок рgМ и оболочечный белок Е, специфичному виду клеща. Нарушение целостности этого региона приводит к снижению эффективности трансмиссии, а его полная замена на неспецифичный фрагмент генома полностью блокирует передачу ВКЭ между зараженными и незараженными клещами. На данном этапе не представляется возможности точно определить роль каждого из вовлеченных в этот процесс генов, хотя повышенная значимость фрагмента генома, кодирующего 5'НТР и ген капсидного белка С, является высоко вероятной.

Вирулентность ВКЭ для клеток млекопитающих (в модели клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ) на фундаментальном уровне определяется, главным образом, свойствами неструктурных генов вируса. Однако точечные мутации в структурном гене Е могут существенно модифицировать патогенетические характеристики ВКЭ в сторону увеличения вирулентности, о чем свидетельствует повышенная частота изоляции ВКЭ разных субтипов с мутацией Е67D от больных людей и млекопитающих. Следовательно, практически любой штамм ВКЭ может стать высокопатогенным для человека за очень короткий промежуток

времени. Это также подтверждается впервые описанным в данной работе случаем гибели человека в результате заболевания, вызванного изолятом ВКЭ, относящегося к линии «886-84», которая ранее считалась низковирулентной.

По нашему мнению, одним из новых направлений работ по контролю заболеваний, передающихся при укусах клещей, может стать разработка методов снижения зараженности клещей в природе. Полученные нами данные показывают, что эффективность неvirемической трансмиссии (один из основных путей циркуляции «клещевых» патогенов в природе) ВКЭ, зависит от свойств структурных генов, прежде всего, белка оболочки Е и эффективности взаимодействия их ансамбля с организмом беспозвоночного хозяина. В том случае, если будет разработан способ направленного блокирования взаимодействия структурных белков ВКЭ с клетками хозяина в естественных популяциях клещей, это подорвет процесс неvirемической трансмиссии клещевых микроорганизмов и приведет к существенному снижению зараженности клещей ВКЭ, а возможно и к постепенной элиминации вируса из естественных сообществ. Поскольку механизмы циркуляции «клещевых» патогенов и их экологические характеристики во многом сходны, высока вероятность того, что сделанные нами заключения будут применимы и к бактериям, инфицирующим иксодовых клещей.

ВЫВОДЫ

1. В Восточной Сибири и в Монголии циркулирует идентичный спектр видов клещевых патогенов, который является типичным для биоценозов северной Евразии и включает вирус клещевого энцефалита, *Borrelia garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii*, микроорганизм «Montezuma», а также впервые выявленные некультивируемые бактерии р. *Burkholderia sp.* и *Pseudomonas sp.*

2. Стабильное существование природных очагов ВКЭ, а также *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *Rickettsia sp.* обеспечивается за счет формирования региональных популяций, которые адаптированы к циркуляции в эндемичных экосистемах. На генетическом уровне это проявляется в существенном внутривидовом полиморфизме первичной структуры генома вируса и бактерий и приуроченности генетических вариантов к определенным эколого-географическим районам.

3. Доказано, что ВКЭ линии «886-84» распространены на территории Монголии, могут передаваться человеку при укусах иксодовых клещей, вызывать заболевание КЭ в менингеальной форме и приводить к летальному исходу инфекции.

4. Экспериментально доказано, что, вне зависимости от субтипа вируса, адаптивные точечные мутации в позициях 67, 122 и 277 белка Е ВКЭ экспонированы на поверхности вириона, приводят к сдвигу заряда и/или гидрофобности поверхности вириона ВКЭ, блокируют

гемагглютинирующие свойства ВКЭ и приводят к повышению эффективности репродукции и неvirемической трансмиссии ВКЭ в клещах *I. ricinus*. У ВКЭ с данным типом адаптивной изменчивости нет способности к формированию устойчивых природных популяций, их доля в общей популяции вируса составляет порядка 7%.

5. Установлено, что устойчивая неvirемическая трансмиссия ВКЭ европейского субтипа возможна только при точном соответствии целого региона генома, кодирующего 5' нетранслируемый регион, капсидный белок С, мембранный белок рgМ и оболочечный белок Е, специфичному виду клеща *I. ricinus*. Нарушение целостности этого региона приводит к существенному снижению эффективности трансмиссии, а его полная замена на гетерологичный фрагмент генома полностью блокирует передачу ВКЭ между зараженными и незараженными *I. ricinus*.

6. Вирулентность ВКЭ для клеток млекопитающих определяется свойствами неструктурных генов вируса, однако адаптивные мутации в структурном гене Е способны существенно модифицировать патогенетические характеристики ВКЭ, что подтверждается повышенной частотой изоляции вирусов с мутацией E67D от больных людей и млекопитающих.

7. Анализ репродуктивных чисел инфекции R0 рекомбинантных ВКЭ с различной генетической структурой позволяет предположить, что при эффективности неvirемической трансмиссии ВКЭ европейского субтипа ниже 27 %, циркуляция вируса в экосистеме становится неустойчивой. В естественных условиях это с высокой вероятностью приведет к снижению зараженности клещей ВКЭ вплоть до полной элиминации вируса.

8. ВКЭ обладает как минимум двумя типами генетической изменчивости, приводящими к существенному изменению биологических свойств вируса. С одной стороны, при адаптации ВКЭ к организму хозяина, происходят точечные мутации в критических аминокислотных позициях белка Е. С другой стороны, внутри вида ВКЭ формируются устойчивые эволюционные линии вируса, адаптированные к локальным экосистемам и обеспечивающие наиболее эффективную неvirемическую трансмиссию среди эндемичных видов клещей.

9. Экстраполяция экспериментальных исследований на изучаемые природные очаги позволяет предположить, что генетическое разнообразие ВКЭ в Восточной Сибири и Монголии сформировано в результате приспособления локальных популяций вируса к неvirемической трансмиссии между клещами *I. persulcatus* в условиях зооценозов бассейна р. Селенга, оз. Байкал и бассейна р. Ангара. Эндемичными в Восточной Сибири и Монголии являются эволюционные линии «Васильченко» и «886-84» и их циркуляция является стабильной.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Обнаружение новой риккетсии в клещах *Dermacentor silvarum* в Прибайкалье / Беликов С.И., Дигас С.Э., Хаснатинов М.А. // Журн. эпидемиол., микробиологии и иммунологии. – 2001. - № 5.- С. 8-11;
2. Генотипирование возбудителя клещевого боррелиоза в Прибайкалье с помощью полимеразной цепной реакции / Хаснатинов М.А., Беликов С.И., Злобин В.И. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2001.- № 2.- С. 134-135;
3. Итоги молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита в институте эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (1998-2002 гг.) / Злобин В.И., Беликов С.И., Мамаев Л.В., Горин О.З., Джюев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Бутина Т.В., Газо М.Х., Данчинова Г.А., Борисов В.А., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В. // Acta Biomedica Scientifica. – 2002.- № 4-1.- С. 9-13;
4. Изучение генетического разнообразия боррелий на территории Иркутской области / Хаснатинов М.А., Беликов С.И., Злобин В.И. // Acta Biomedica Scientifica. – 2002.- № 4-1.- С. 121-123;
5. Природные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории северной и центральной Монголии / Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И., Горин О.З. // Acta Biomedica Scientifica. – 2002.- № 4-1.- С. 52-54;
6. Изоляция и генотипирование *Borrelia burgdorferi sensu lato* из клещей в республике Монголия / Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Абмэд Д. // Acta Biomedica Scientifica. – 2004.- № 1-3. - С. 197-201.
7. Переносчики и возбудители трансмиссивных клещевых инфекций на юге Восточной Сибири и севере Монголии / Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Сунцова О.В., Бадуюева Л.Б., Горина М.О., Шулунов С.С., Дигас С.Э., Козлова И.В., Верховина М.М., Черногор Л.И., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., Беликов С.И., Борисов В.А., Злобин В.И., Абмэд Д., Батаа Ж., Бат-Очир Д., Ценд Н., Нарантуяа Л. // Acta Biomedica Scientifica. – 2004.- № 1-3. - С. 107-112;
8. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах балтии, восточной и юго-восточной Европы / Адельшин Р.В., Злобин В.И., Беликов С.И., Джюев Ю.П., Демина Т.В., Газо М.Х., Козлова И.В., Верховина М.М., Вотяков В.И., Титов Л.П., Самойлова Т.И., Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Воронко И.В., Голубович С., Тешанович М., Приймаги Л.С., Василенко В.А. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2006.- № 2 (27).- С. 27-34;
9. Иксодовые клещи юга Восточной Сибири и Монголии и их спонтанная зараженность возбудителями природно-очаговых трансмиссивных инфекций / Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И., Козлова И.В., Верховина М.М., Сунцова О.В., Шулунов С.С., Абмэд Д.,

- Батаа Ж., Бат-Очир Д., Цэнд Н., Бадурева Л.Б., Лисак О.В., Горина М.О. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. - Т. 5. - № S1. - С. 137-143;
10. Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia / Walder G., Orth D., Würzner R., Dierich M.P., Lkhamsuren E., Batmunkh T., Shagdar A., Bataa J., Heinz F.X., Danchinova G.A., Khasnatinov M.A. // International Journal of Medical Microbiology. – 2006. - Т. 296. - № SUPPL. 1. - С. 69-75;
11. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В., Беликов С.И., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Исаева Е.И., Гришечкин А.Е. // Вопросы вирусологии. – 2007. - Т. 52.- № 6. - С. 4-13;
12. Гетерогенность гена р83/100 комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* / Фоменко Н.В., Сабитова Ю.В., Хаснатинов М.А., Гольцова Н.А., Данчинова Г.А., Батаа Ж., Амбед Д., Стронин О.В. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2007.- № 4.- С. 31-36;
13. Клещевой риккетсиоз в Прибайкалье: современная эпидемиологическая ситуация и генетическая вариабельность возбудителя / Козлова И.В., Злобин В.И., Верхозина М.М., Дигас С.Э., Хаснатинов М.А., Шулунов С.С., Аитов К.А., Беликов С.И., Лисак О.В., Дорощенко Е.К. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2007.- № 6 (37). - С. 16-22;
14. Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза, анаплазмоза и эрлихиоза в иксодовых клещах / Шулунов С.С., Хаснатинов М.А., Глушенкова Т.Е., Данчинова Г.А., Адельшин Р.В., Беликов С.И. // Acta Biomedica Scientifica. – 2007.- № 1 (53). - С. 243-244;
15. Разнообразие риккетсий в иксодовых клещах на территории Прибайкалья / Шулунов С.С., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Козлова К.В., Адельшин Р.В., Беликов С.И. // Acta Biomedica Scientifica. – 2007. - № 1 (53). - С. 83-85;
16. Распространение иксодовых клещей и клещевых инфекций на приграничных российско-монгольских территориях / Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И., Абмэд Д. // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008.- № 3 S2-2.- С. 586-587;
17. Гетерогенность структуры гена OspA у изолятов *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* из Западной Сибири и Монголии / Фоменко Н.В., Стронин О.В., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Батаа Ж., Гольцова Н.А. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009.- № 4. - С. 18-22;
18. Non-hemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to european ticks / Khasnatinov M.A., Gritsun T.S., Ustanikova K., Klempa B., Eleckova E., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Gould E.A. // PLoS ONE. – 2009.- Т. 4.- № 10.- С. e7295;

19. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии / Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Кулакова Н.В., Tungalag K., Арбатская Е.В., Миронова Л.В., Tserennorov D., Bolormaa G., Otgonbaatar D., Злобин В.И. // Вопросы вирусологии. – 2010.- Т. 55.- № 3.- С. 27-32;
20. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia / Khasnatinov M., Tserennorov D., Nymadavaa P., Tchaporgina E.A., Glushenkova T., Arbatskaya E., Bataa J., Abmed D., Danchinova G.A., Otgonbaatar D. // International Journal of Infectious Diseases. – 2010.- Т. 14.- № Suppl. 1.- С. e372-e373;
21. Specific point mutations in the envelope protein of tick-borne encephalitis virus enhance non-viraemic transmission efficiency in a tick vector / Khasnatinov M., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E.A., Gritsun T.S. // International Journal of Infectious Diseases. – 2010.- Т. 14.- № Suppl.- 1.- С. e45-e46;
22. Клещевой энцефалит: встречаемость и профилактика инфекции на доклинической стадии у людей, пострадавших от присасывания иксодовых клещей / Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В., Данчинова Г.А., Чапоргина Е.А., Арбатская Е.В., Туник Т.В., Петрова И.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012.- № 5.- С. 19-24;
23. Сравнительное исследование анаплазм в Японии и других странах / Масузава Т., Охашаи Н., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Иванов Л.И., Фукуи Т., Окамото Й., Пан М.Д., Коизуми Н. // Acta Biomedica Scientifica. – 2012.- № 5-1 (87). - С. 155-157;
24. Итоги исследований клещевых инфекций в Монголии / Абмэд Д., Батаа Ж., Ану Д., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Нимадаваа П., Нимахуу Д. // Acta Biomedica Scientifica. – 2012.- № 5-1 (87).- С. 171-172;
25. Распространение клещевых инфекций в бассейне р. Селенга на территории Республики Бурятия и Монголии / Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В., Шобоева Р.С., Ханхареев С.С., Абмэд Д., Бата Ж., Цэрэнноров Д., Отгонбаатор Д. // Acta Biomedica Scientifica. – 2012.- № 5-1 (87). - С. 206-209;
26. Роль структурных белков вируса клещевого энцефалита в осуществлении неvirемической трансмиссии вируса между клещами / Хаснатинов М.А., Хавликова С., Таплин Э., Казимирова М., Гунавардане Н., Словак М., Клемпа Б., Джоунс И.М., Лабуда М., Гоулд Э.А., Грицун Т.С. // Acta Biomedica Scientifica. – 2012.- № 5-1 (87).- С. 331-334;
27. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences / Moureau G., Cook Sh., Lemey Ph., Forrester Nl., Nougairède A., Khasnatinov M., Charrel Rn., Firth Ae., Gould E.A., Lamballerie X. // PLoS ONE.– 2015.-Т. 10.- №2.- С. e0117849;

28. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* in Irkutsk city and its neighboring territories, Russia / Khasnatinov M.A., Danchinova GA, Takano A., Kawabata H., Ohashi N., Masuzawa T. // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2016.- Т. 7. - № 2.- С. 394-397;
29. Tick-borne encephalitis virus structural proteins are the primary viral determinants of non-viraemic transmission between ticks whereas non-structural proteins affect cytotoxicity / Khasnatinov M.A., Tuplin A., Gritsun D.J., Slovak M., Kazimirova M., Lickova M., Havlikova S., Klempa B., Labuda M., Gould E.A., Gritsun T.S. // PLoS ONE. – 2016.- Т. 11.- № 6.- С. e0158105;
30. Prevalence of tick-borne pathogens in hard ticks that attacked human hosts in Eastern Siberia / Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Liapunov A.V., Manzarova E.L., Petrova I.V., Lyapunova N.A., Solovarov I.S. // International Journal of Biomedicine. – 2017.- Т. 7.- № 4.- С. 307-309;
31. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates from Western Siberia, Russia and northern Mongolia / Sabitova Y., Tikunov A., Golovljova I., Tikunova N., Fomenko N., Stronin O., Khasnatinov M., Danchinova G., Abmed D. // Infection, Genetics and Evolution. – 2018.- Т. 62.- С. 160-169.

Методические рекомендации:

Данчинова Г.А., Козлова И.В., Шурыгина И.А., Чапоргина Е.А., Верхозина М.М., Хаснатинов М.А., Черногор Л.И., Сунцова О.В., Лисак О.В., Дорощенко Е.К., Бадыева Л.Б., Шулунов С.С. Иксодовый клещевой боррелиоз: тактика клинико-эпидемиологического, лабораторного обследования и профилактики заболевания (Методические рекомендации МР 3.2.002 - 06), Иркутск, 2006. – 15 с.

Список сокращений:

- ВКЭ - Вирус клещевого энцефалита
- ДВ-ВКЭ - Вирус клещевого энцефалита Дальневосточного субтипа
- ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота
- Е-ВКЭ - Вирус клещевого энцефалита Европейского субтипа
- ИСС - Информационно-справочная система
- КЭ - Клещевой энцефалит
- НВТ - Невиремическая трансмиссия
- ОТ - Реакция обратной транскрипции
- ПЦР - Полимеразная цепная реакция
- РГА - Реакция гемагглютинации
- РНИФ - Реакция непрямой иммунофлуоресценции
- РНК - Рибонуклеиновая кислота
- РТГА - Реакция торможения гемагглютинации
- СИБ-ВКЭ - Вирус клещевого энцефалита Сибирского субтипа
- СПЭВ - Перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи
- 5'НТР - 5' нетранслируемый регион генома вируса клещевого энцефалита
- R0 - Репродуктивное число инфекции
- ЭТ - Эффективность неvirемической трансмиссии

ХАСНАТИНОВ МАКСИМ АНАТОЛЬЕВИЧ

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО
ЭНЦЕФАЛИТА И ДРУГИХ КЛЕЩЕВЫХ ПАТОГЕНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ
УСТОЙЧИВОГО СУЩЕСТВОВАНИЯ ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ В ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ И
МОНГОЛИИ**

03.02.02 «вирусология» (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Подписано в печать _____. Формат 60х90/16
усл. печ. л. 2,0 Тираж 100 экз. Заказ № 004-18
Отпечатано в РИО ИНЦХТ.
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1.
Тел. (3952) 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com