

На правах рукописи

**Охотина
Юлия Сергеевна**

**КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2023

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

Научный руководитель: *Козлова Ирина Валерьевна*, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ

Официальные оппоненты: *Карганова Галина Григорьевна*, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии арбовирусов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН

Шаршов Кирилл Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Ведущая организация: ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Защита состоится «15» марта 2024 г. в 11:30 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 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, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

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

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

И.о. ученого секретаря диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее распространенных природно-очаговых нейроинфекций, передающихся через укусы иксодовых клещей. Возбудитель инфекции – вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*.

В рамках современных представлений о генетической вариабельности выделяют три основных субтипа (генотипа) ВКЭ: 1) дальневосточный; 2) европейский или западный; 3) сибирский. В последние годы описано еще два предполагаемых субтипа ВКЭ – Байкальский и Гималайский (Демина Т. В., 2012; Козлова И. В., 2012; Kozlova I. V., 2018; Dai X., 2018). Каждый из субтипов вируса, за исключением Гималайского, обладает собственным ареалом, ассоциирован с определенным видом клеща-переносчика и кругом позвоночных хозяев, обладает разным патогенным потенциалом для человека.

Зоной доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Циркуляция этого варианта вируса также выявлена на территории европейской части России, в Южной Корее и Северной Африке (Тунис) (Kim S. Y., 2008; Yun S. M., 2009; Fares W., 2021). В настоящее время в Европе наблюдается расширение ареала ВКЭ-ЕС, увеличение уровня заболеваемости, рост числа стран, в которых регистрируются случаи КЭ (Gritsun T. S., 2003; Ruzek D., 2010; Suss J., 2007, 2011; Коренберг Э. И., 2013). В последние годы появились сведения о тяжелых случаях заболевания, вызванных данным вариантом вируса. При этом ранее считалось, что штаммы ВКЭ-ЕС обладают меньшей вирулентностью и нейроинвазивностью по сравнению со штаммами других субтипов вируса, и с ним ассоциированы заболевания человека с более мягким течением и благоприятным исходом (Злобин В. И., 1996; Вотяков В. И., 2002; Zajkowska J., 2013; Bogovic P., 2015; Dobler G., 2019; Ruzek D., 2019).

Данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют о стабильности генома ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы, и его более древнем происхождении (Zanotto P. M., 1995; Gaumann R., 2011; Weidmann M., 2013; Ruzek D., 2006; Dobler G., 2012). Однако появившиеся недавно сведения о новых дивергентных вариантах ВКЭ-ЕС в Нидерландах (Jahfari S., 2017) и Великобритании (Holding M., 2019), расширяющих установленные ранее границы вариабельности внутри данного субтипа вируса, а также наличие крайне противоречивых результатов, полученных при реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС разными авторами, свидетельствуют об актуальности продолжения филогенетических и филогеографических исследований.

Степень разработанности темы

Несмотря на то, что в музейных коллекциях ряда научных учреждений Сибири уже давно хранились штаммы ВКЭ западного подтипа, их исследование с помощью современных молекулярно-генетических методов началось относительно недавно.

На основании изучения коллекционных штаммов с помощью методов молекулярной эпидемиологии была получена картина географического распространения ВКЭ-ЕС на территории бывшего СССР. В последние годы появились новые данные об изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории Западной и Восточной Сибири, получили этиологическое подтверждение случаи заболеваний, связанные с данным вариантом вируса в регионе, в том числе с летальным исходом (Сидорова Е. А., 2019).

В настоящее время установлено, что зоной абсолютного доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Крайней восточной точкой ареала, где на сегодняшний день выявлен ВКЭ-ЕС, является Южная Корея. Учитывая абсолютное доминирование ВКЭ-ЕС в Европе, его экология, генетические и фенотипические свойства относительно хорошо изучены. Установлен основной переносчик и резервуарный хозяин ВКЭ-ЕС в Европе – клещ *I. ricinus* (Nosek J., 1970; Gaumann R., 2010; Chitimia-Dobler L., 2019; Klaus C., 2013). Выявлен спектр компетентных позвоночных хозяев ВКЭ-ЕС, играющих основную роль в резервации и передаче вируса (Chitimia-Dobler L., 2019), описаны биотопы, в которых происходит его циркуляция.

На территории Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует в экосистемах, значительно отличающихся от основного европейского ареала вируса составом природных комплексов и биоценозов. В том числе эти различия касаются спектра основных переносчиков и резервуарных хозяев. В связи с этим научный интерес представляет изучение и сравнительный анализ генетических, фенотипических свойств, экологических и эволюционных особенностей штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных в удаленных друг от друга точках ареала (Европа и Восточная Сибирь).

Цель работы – выявление генетических, фенотипических, экологических и эволюционных особенностей вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-ЕС из Европы, Южной Кореи и Сибири и выявить генетические свойства штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. Оценить особенности генетической характеристики штаммов ВКЭ-ЕС в зависимости от источника и территории изоляции штаммов.

2. Изучить фенотипические свойства штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Сибири (степень нейровирулентности, инвазивные свойства; генетические признаки, обусловленные белками оболочки вириона; маркеры, связанные с внутриклеточной репродукцией вируса).

3. Получить характеристику биотопов на территории Западной и Восточной Сибири, в которых выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС.

4. Определить эволюционный возраст популяции ВКЭ-ЕС на территории Западной и Восточной Сибири.

5. Дать комплексную характеристику ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

Впервые получена комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, реконструирована его эволюционная история. С помощью филогенетического анализа показано, что уровень различий между нуклеотидными последовательностями кодирующей части генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает таковой между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами группы *Louping ill*. Впервые в ходе сравнительного геномного и биоинформационного анализа штаммов ВКЭ-ЕС установлено, что штаммы из Сибири формируют две отдельные клады в составе самого обширного кластера, образованного штаммами из Восточной, Западной, Северной Европы и штаммами из Южной Кореи. В результате сравнительного анализа геномов штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных из различных источников, высказано предположение о том, что кластеризация штаммов на дендрограммах в большей степени зависит от места их изоляции, нежели от источника и года их выделения. Впервые охарактеризованы генетические особенности штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. Показано, что сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя генетическими линиями (восточносибирский и западносибирский варианты), которые отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Обнаружены делеции в варибельной части 3'-нетранслируемой области генома у штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири, сопоставимые по длине со штаммом *Huyp* (U39292) из Чешской Республики. Не установлено связи между наличием делеций в геноме и вирулентностью штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири. Впервые показано, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, при этом основным переносчиком и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию данного варианта вируса на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы. Установлено, что основным переносчиком ВКЭ-ЕС в Сибири является клещ *I. persulcatus*, а циркуляция ВКЭ-ЕС на территории региона поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевками, а также сусликами, насекомоядными, зайцеобразными и некоторыми видами птиц. Показано, что ВКЭ-ЕС в азиатской части России существует в условиях климата от умеренно до резко континентального.

Установлено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам (S-признак, rct₄₂ и T₅₀ признаки, вирулентность и нейроинвазивность). Впервые с помощью метода Байесовских Марковских цепей Монте-Карло

определено время дивергенции западносибирского и восточносибирского вариантов ВКЭ-ЕС от ближайшего общего предка, которое составило 663 года (95 % НРD, 399-971). Показано, что западносибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым, время дивергенции для него составляет 314 лет (95 % НРD, 196-453).

Теоретическая значимость работы заключается в расширении имеющихся на сегодняшний день фундаментальных знаний о генетике, генетической изменчивости, экологии и эволюции ВКЭ.

Практическая значимость

Проведенное исследование имеет важное прикладное значение, так как данные об особенностях генетической организации и фенотипической изменчивости ВКЭ являются научной базой для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции. Создана база данных «Генетические и фенотипические свойства штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, изолированных на территории Евразии» (свидетельство о государственной регистрации № 2017620500 от 3.05.2017 г.), которая позволяет: проводить сравнительный анализ геномов и фенотипических свойств штаммов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы и Азии, осуществлять целенаправленный скрининг штаммов по отдельным категориям (источник, страна, год изоляции, наличие информации о биологических свойствах), использовать эти данные для эволюционных построений, поиска сайтов рекомбинации, а также для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции.

Расшифрован полный геном восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири, нуклеотидные последовательности которых депонированы в международную электронную базу данных GenBank: *IG-98*(KY069119); *118-71* (KY069120); *163-74* (KY069121); *262-74* (KY069122); *126-71* (KY069123); *Zmeinogorsk-1* (KY069124); *Zmeinogorsk-5* (KY069125); *Zmeinogorsk-9* (KY069126).

Методология и методы исследования

Достижение поставленной цели осуществлялось путем комплексного подхода к решению задач с использованием набора классических и современных методов исследования. Результаты были получены при помощи вирусологических (культивирование вирусов *in vitro* и *in vivo*, титрование по ЦПД, бляшкообразованию, определение S-признака, T₅₀ и gct₄₂-признаков), молекулярно-биологических (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, полногеномное секвенирование Сэнгера) и методов биоинформатического анализа (сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На территории Сибири циркулирует гетерогенная по генетическим и фенотипическим свойствам популяция ВКЭ-ЕС.

2. ВКЭ-ЕС на территории Сибири представлен двумя генетическими вариантами – восточносибирским и западносибирским, которые отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B.

3. Время дивергенции восточносибирского и западносибирского вариантов от ближайшего общего предка составляет 663 года (с 95 % НРD 399–971), при этом западносибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым (tMRCA составляет 314 лет (95 % НРD 196–453)).

4. Несмотря на циркуляцию на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, характеристикам биотопов, ВКЭ-ЕС на территории Сибири обладает высоким уровнем стабильности генома, его генетические различия не превышают таковых для основной части штаммов данного субтипа из Европы.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Результаты работы неоднократно устно представлены автором на различных международных конференциях.

Основные результаты исследований по теме диссертации были представлены на: 15th Medical Biodefense Conference (Мюнхен, Германия, 2016); 83-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 140-летию со дня рождения профессора Н.Д. Бушмакина (Иркутск, 2016); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 2016); International Scientific-Practical Conference «Climate, ecology, agriculture of Eurasia» (Улан-Батор, Монголия, 2017); International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ITPD 2017 (Вена, Австрия, 2017); Российской научной конференции, посвященной 80-летию открытия вируса клещевого энцефалита «Клещевой энцефалит и другие переносимые клещами инфекции» (Москва, 2017); конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням 2018 г. (Новосибирск, 2018); IV Национальном конгрессе бактериологов и Международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» (Омск, 2018); 16th Medical Biodefense Conference (Мюнхен, Германия, 2018); III Байкальской международной научной конференции «Природно-очаговые трансмиссивные инфекции» (Иркутск, 2018); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Беларусь, 2018); Российской научно-практической конференции «Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2019); International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease (Вена, Австрия, 2019); 14-th International Symposium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ISTTBD-XIV) (Веймар, Германия, 2021); Международной научной конференции «Россия и Монголия: результаты и перспективы научного сотрудничества» (Иркутск, 2022); Региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск, 2022); Российской научно-практической конференции с трансляцией в интернет «Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2023).

Публикации по материалам исследования

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 8 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, две коллективные монографии.

Личный вклад автора

Автором лично получены основные результаты, представленные в работе, осуществлен анализ данных и сформулированы выводы, проведено большинство лабораторных исследований. Секвенирование штаммов ВКЭ-ЕС было выполнено в Центре секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск) в сотрудничестве с к.б.н. С.Е. Ткачевым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск). Изучение генетических признаков, определяемых «*in vitro*», и признаков, связанных с вирулентностью, у штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири выполнено совместно с д.б.н. М.М. Верховиной. Филогенетический анализ проведен в сотрудничестве с к.б.н. Ю.С. Букиным (Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск) и А.И. Парамоновым (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ).

Часть исследований выполнена в рамках гранта РФФИ №14-15-00615 «Сравнительный геномный и биоинформационный анализ штаммов европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего в экосистемах Сибири и Западной Европы», участником которого являлась автор диссертации.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 156 листах, состоит из введения, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 193 источника, в том числе 24 – работы отечественных и 166 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 19 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы включает четыре раздела, в которых представлены современные сведения о таксономии флавивирусов, строении и организации генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), рассматриваются вопросы дивергенции и эволюции ВКЭ, проанализированы и обобщены данные о ВКЭ-ЕС, циркулирующего в пределах его основного европейского ареала.

Материалы и методы

Штаммы вируса клещевого энцефалита. В работе использовано 14 штаммов ВКЭ-ЕС из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (№ 478258 скр.rf.ru), которые были изолированы на территории Восточной и Западной Сибири в период с 1971 по 1998 гг. Штаммы пассировали путем интрацеребрального заражения 1-3-дневных новорожденных белых мышей или в перевиваемой клеточной культуре почки эмбриона свиньи (СПЭВ).

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности штаммов ВКЭ-ЕС. В ходе исследования были определены полные геномы пяти штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири и трех штаммов из Западной Сибири. Кроме того, в изучаемую выборку были включены последовательности полипротеина штаммов из Восточной Сибири – *Sorex 18-10* (№ доступа GenBank KP938507), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *IrkutskBR99-08* (KP331441) и штамма *84.2* из Алтая (HM120875), а также все доступные на момент начала наших исследований полногеномные последовательности ВКЭ-ЕС в международной электронной базе данных GenBank.

Клеточные культуры. Использовали перевиваемую культуру клеток СПЭВ, которую пересеивали из расчета 1,0–1,5 млн. клеток в 1 мл.

Культивирование штаммов ВКЭ. В работе использовали инфицированные ВКЭ мозговые ткани новорожденных белых мышей и суспензии культуры клеток СПЭВ. Для накопления вируса готовили суспензию из лиофилизированных штаммов в разведении 10^{-3} с применением среды Игла MEM, 2%-й сыворотки КРС и антибиотиков (200 Ед/мл) и проводили заражение сосунков нелинейных белых мышей (0,03 мл – интрацеребрально) или перевиваемой культуры клеток СПЭВ. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755), а также в соответствии с Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986). Выполнение экспериментальных исследований на лабораторных животных одобрено комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Выписка из протокола № 6.1 от 20.11.2017 г.).

Титрование штаммов ВКЭ по ЦПД проводили в культуре клеток СПЭВ в 96-луночных планшетах. Титры вируса определяли по методу Рида и Менча (Reed L., 1938) и выражали в lgТЦД₅₀/мл. Титрование вирусов по бляшкообразованию проводили в культуре клеток СПЭВ, выращенной в пластиковых 24-луночных планшетах фирмы «Sarstedt», под агаровым покрытием.

S-признак. Учет размера бляшек проводился на 5-е сутки после заражения, когда бляшки увеличивались в размере и становились более отчетливыми и прозрачными. S-признак учитывался как S⁺ при диаметре бляшки (d) ≥ 2,5 мм; S[±] – при 2,5 > d ≥ 2,0; S⁻ – при 2,0 > d ≥ 1,0 (Верхозина М. М., 2017).

Терморезистентность (Т₅₀) штаммов ВКЭ изучали по методу, описанному Э. А. Овчинниковой и др. (Овчинникова Э. А., 1967) с использованием суточной культуры клеток СПЭВ, выращенной в 96-луночных планшетах в атмосфере CO₂. Уровень терморезистентности

оценивали по индексу инактивации – разность lg титров прогретого (50 °C) в течение 15 мин и непрогретого (4 °C) вируса.

Rct₄₂-признак (способность вируса к репродукции при супраоптимальной температуре) определяли по разнице lg титров вируса при культивировании штаммов в культуре клеток СПЭВ при температуре 37 °C и 42 °C. При разнице титров $\leq 2,0$ lg генетический признак оценивали как rct₄₂₊, от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный, $\geq 3,1$ lg – как rct₄₂₋.

Нейровирулентность и инвазивные свойства штаммов оценивали по **индексу инвазивности (II)** – разнице титров вируса при интрацеребральном (mNic) и подкожном (mNsc) заражении мышей, выраженной в lgLD50/мл (Pogodina V. V., 1964). Заражали беспородных белых мышей массой 6–8 г интрацеребрально по 0,03 мл, подкожно по 0,25 мл инокулята. Животных, зараженных в мозг, наблюдали в течение 14 дней, зараженных экстраневрально – 21 день. Титры вируса определяли по методу Рида и Менча (Reed L., 1938). Значение II в пределах 1–2,5 свидетельствовало о высоких инвазивных свойствах штамма, способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней. Значение II ≥ 3 указывало на сниженную инвазивную активность штамма.

Экстракция РНК. Готовили 10%-е суспензии головного мозга мышей, инфицированных ВКЭ, центрифугировали их при 300 об./мин. в течение 15 мин. 100 мкл супернатанта суспензии использовали для экстракции РНК с помощью набора реагентов «РИБО-преп».

Аmplификация ДНК. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Reverta L-100, содержащего рандомизированные экзануклеотиды (Amplisense, Россия). ПЦР-реакцию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси согласно инструкциям производителя (BioSan, Россия) с 3 мкл ДНК и парой соответствующих праймеров.

Секвенирование ДНК. Для полногеномного секвенирования использовали наборы ПЦР-фрагментов разной длины (298–693 п.н.), соответствующих определенным фрагментам генома ВКЭ и перекрывающихся друг с другом на 50–100 п.н. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных с помощью колонок GFX (Amersham Biosciences, США), определяли с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Сборку последовательностей ПЦР-фрагментов в полногеномные проводили с помощью программы MEGA 6.0 (Tamura K., 2013). Определенные в ходе выполнения работы последовательности генома ВКЭ зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами доступа KY069119-KY069126.

Анализ последовательностей вируса клещевого энцефалита. В исследование было взято 72 полногеномные нуклеотидные последовательности ВКЭ-ЕС из базы данных ViPR и GenBank. Молекулярно-генетический и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0 (Tamura K., 2013). Дендрограммы построены методом максимальной вероятности (ML). Стабильность построенных деревьев оценивалась бутстреп-анализом с 1000 повторений.

Анализ последовательностей ВКЭ. Выравнивание нуклеотидных последовательностей произведено с помощью программы MUSCLE. Филогенетический анализ выполнен методом Bayesian Markov chain Monte-Carlo в пакете программ BEAST v. 1.10.4. Достоверность построенных деревьев оценивали с помощью показателя апостериорной вероятности. Подготовка входных xml файлов для байесовского анализа была проведена в программе BEAUTI из пакета BEAST. Для определения времени дивергенции штаммов для каждого из них указывалась дата изоляции согласно базам данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) и ViPR (<http://www.viprbrc.org/>). В качестве модели накопления нуклеотидных замен использована модель GTR (GeneralTime-reversible). В качестве модели гетерогенности сайтов применялась модель Gamma+Invariant Sites (число гамма-категорий – 4). Использована модель ослабленных (некоррелированных логнормальных) молекулярных часов. Анализ МСМС проводился 100 миллионов поколений с отбором каждого тысячного поколения и 10%-м отжигом. Сходимость параметров оценивалась на основе достижения ESS значений > 200 с использованием программного обеспечения Tracer версии 1.5. Дерево с максимальной достоверностью клад (MCC) было сгенерировано с помощью Tree Annotator и визуализировано в FigTree v. 1.4.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа геномов штаммов европейского субтипа вируса клещевого энцефалита из электронных баз GenBank и ViPR

Проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС и других субтипов вируса, а также некоторых представителей флавивирусов, переносимых клещами, депонированных в электронную базу данных GenBank и ViPR. Для этих целей на основе данных о 190 полногеномных последовательностях ВКЭ (10245 п.н.) с помощью метода Bayesian Markov chain Monte-Carlo было построено филогенетическое древо (Рисунок 1).

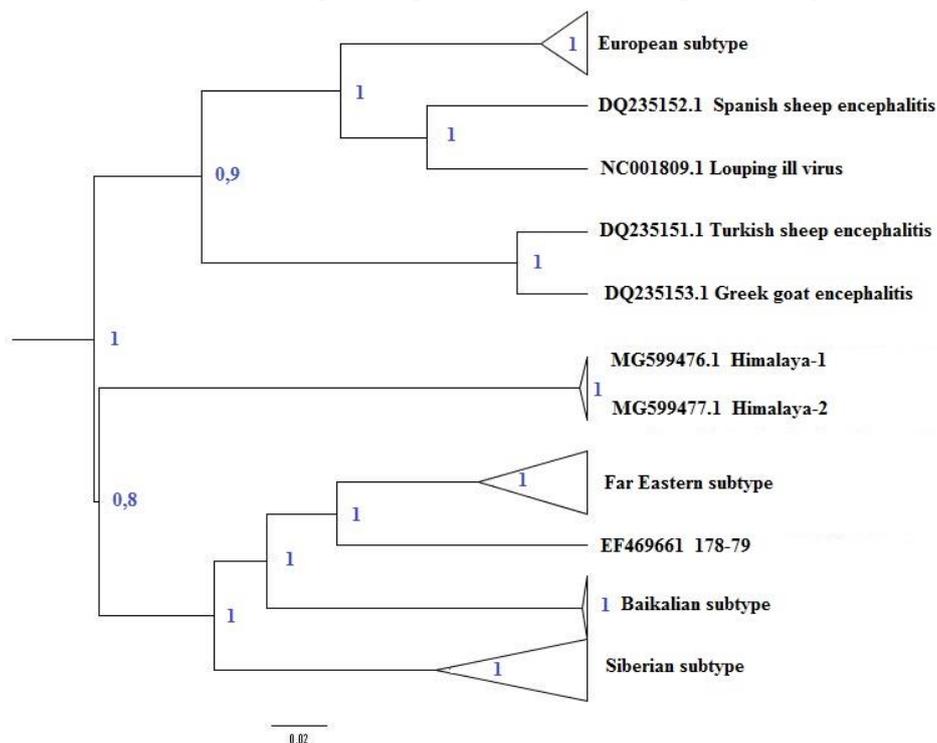


Рисунок 1 – Филогенетическое древо, построенное на основе 190 полногеномных последовательностей ВКЭ (10245 п.н.) с помощью метода Bayesian Markov chain Monte-Carlo в пакете программ BEAST v. 1.10.4

На данном древе нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ образовали два кластера. В первый из них вошли последовательности ВКЭ-ЕС, а также последовательности вирусов: Шотландского энцефаломиелита овец (ШЭО, LI), Испанского энцефалита овец (SSEV), Турецкого энцефалита овец (TSEV) и Греческого энцефалита коз (GGEV). Причем последовательности вирусов LI и Испанского энцефалита овец, а также Турецкого энцефалита овец и Греческого энцефалита коз образовывали две отдельные клады внутри данного кластера.

Во второй кластер вошли последовательности ВКЭ дальневосточного, сибирского, байкальского, гималайского субтипов и штамма 178-79.

Уровень различий нуклеотидных последовательностей кодирующей области генома штаммов TBEV-Eur составил: с GGEV – 14,2–14,4 %, с TSEV – 14,5–14,9 %, с SSEV – 12,6–13,0 %, вирусом LI – 11,9–13,0 % (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровни различий нуклеотидных последовательностей кодирующей области генома между штаммами вируса клещевого энцефалита европейского субтипа и другими флавивирусами, переносимыми клещами (%)

тип\субтип	Louping ill TBEV			
	TSEV	GGEV	LI	SSEV
ВКЭ-ЕС	14,5–14,9	14,2–14,4	11,9–13,0	12,6–13,0

В то время как уровень различий нуклеотидных последовательностей кодирующей части генома у штаммов ВКЭ-ЕС и других известных субтипов ВКЭ составил: с ВКЭ-ДВ – 16–17 %, с ВКЭ-Сиб – 14–16 %, с ВКЭ-БК – 15–16 %, со штаммом 178-79 и ВКЭ-Гим – 16 % (Таблица 2).

Таблица 2 – Уровни различий нуклеотидных последовательностей кодирующей части генома у различных субтипов ВКЭ (%)

Субтип	ВКЭ-ЕС	ВКЭ-ДВ	ВКЭ-Сиб	ВКЭ-БК	178-79	ВКЭ-Гим
ВКЭ-ЕС	*	16–17	14–16	15–16	16	16
ВКЭ-ДВ	16–17	*	14–15	12–13	11	16
ВКЭ-Сиб	14–16	14–15	*	13–14	14–15	15
ВКЭ-БК	13–14	12–13	13–14	*	12	15
178-79	16	11	14–15	12	*	15–16
ВКЭ-Гим	16	16	15	15	15-16	*

Нами установлено, что различия как в кодирующей области генома, так и в соответствующей ей последовательности полипротеина у штаммов ВКЭ-ЕС, как правило, минимальны (3,1 и 1,5 % соответственно) по сравнению с другими субтипами вируса (Таблица 3), что свидетельствует о более высокой степени генетической однородности данного варианта вируса.

Таблица 3 – Максимальные значения различий между штаммами вируса клещевого энцефалита по кодирующей области генома и по соответствующим последовательностям полипротеина

Субтип ВКЭ	Количество проанализированных последовательностей	Различия по кодирующей области генома	Различия по последовательности полипротеина
ВКЭ-ДВ	75	6,6	2,9
ВКЭ-ЕС	67	3,1	1,5
ВКЭ-Сиб	24	7,8	4,2

Исключение составили два штамма, изолированные на территории Нидерландов и Великобритании (*NL* (LC171402) и *UK-Hampshire2019* (MN661145)), существование которых значительно расширяет установленные ранее границы вариабельности внутри ВКЭ-ЕС приблизительно от 3 до 9 % (Таблица 4).

Нами осуществлен анализ полных последовательностей геномов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Евразии. На момент проведения наших исследований в GenBank находилось 86 последовательностей полипротеина штаммов и изолятов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории 13 европейских стран, а также в России и Южной Корее в период с 1953 по 2019 гг. Для визуализации полученных данных нами было построено филогенетическое древо, на котором мы условно выделили пять кластеров (Рисунок 2).

Таблица 4 – Уровень различий между штаммами вируса клещевого энцефалита европейского субтипа по кодирующей области генома у штаммов из Сибири, прототипным штаммом *Neudoerfl* и из Великобритании *NL* (LC171402)

Название штамма	№ доступа в GenBank	1	2	3	4	5	6
1. 84.2	HM120875	*					
2. <i>Irkutsk BR99-08</i>	KP331441	0.1 %	*				
3. <i>IG-98</i>	KY069119	0.1 %	0.2 %	*			
4. 262-74	KY069122	0.1 %	0.2 %	0.2 %	*		
5. <i>Zmeinogorsk-1</i>	KY069124	1.6 %	1.7 %	1.7 %	1.6 %	*	
6. <i>NL</i>	LC171402	8.6 %	8.7 %	8.7 %	8.7 %	8.6 %	*
7. <i>Neudoerfl</i>	U27495	2.6 %	2.7 %	2.6 %	2.6 %	2.4 %	8.9 %

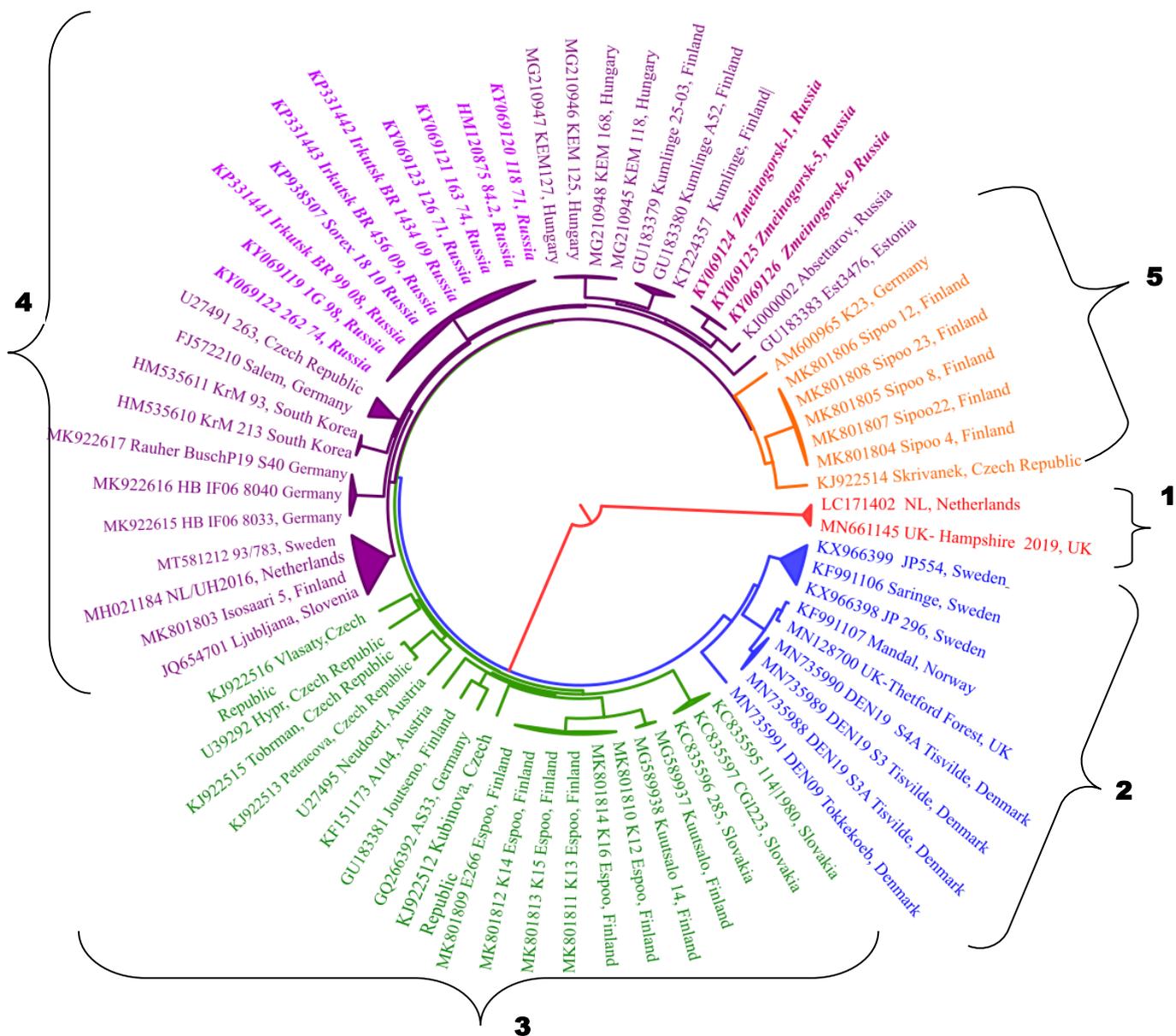


Рисунок 2 – Филогенетическое древо, построенное на основе 60 полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ европейского субтипа с применением байесовского метода Монте-Карло по схеме марковской цепи (MCMC), используемого пакетом программ BEAST v. 1.10.4

В **первый кластер** вошли нуклеотидные последовательности уже упомянутых выше штаммов из Нидерландов и Великобритании. **Второй кластер** образовали штаммы из Норвегии, Великобритании, Дании и Швеции. В **третий кластер** вошли нуклеотидные последовательности штаммов из Словакии, Финляндии, Чехии, Германии, Австрии. Внутри этого кластера выделено несколько отдельных клад. Например, самостоятельные клады сформировали штаммы из Словакии, Финляндии. При этом штаммы *Kuutsalo*, выделенные на территории острова Кутсало (Финляндия) и штаммы *Espoo* из южной части Скандинавского полуострова, группировались отдельно, в соответствии с местом их изоляции.

В **четвертый** самый обширный **кластер** вошли 30 штаммов из Германии, Словении, Финляндии, Нидерландов, Чехии, Венгрии, Эстонии, России, Южной Кореи и Швеции. Внутри

этого кластера также отмечено наличие отдельных клад, сгруппированных преимущественно по территориальному признаку.

Так, например, отдельные клады сформировали штаммы из Германии, Южной Кореи, Восточной и Западной Сибири.

В **пятый кластер** вошли штаммы из Германии, Финляндии и Чехии. Примечательно, что штаммы «*Siproo*» из Финляндии, вошедшие в состав этого кластера, не группировались со штаммами «*Espoo*» из третьего кластера, хотя места их изоляции расположены на территории архипелага всего в 20 км друг от друга. В то время как штаммы с о. Кутсало (Котка), находящегося примерно в 140 км от места изоляции штаммов «*Espoo*», формировали с ними общую кладу.

Несмотря на имеющиеся исключения, как правило, на филогенетическом древе штаммы ВКЭ-ЕС кластеризовались по территориальному признаку. Было показано, что максимальный уровень сходства наблюдается между штаммами, выделенными в одном регионе. Нами осуществлен анализ гомологии и кластеризации штаммов в зависимости от года и источника их изоляции (клещи, больные КЭ люди). Прямой корреляционной связи между уровнем гомологии нуклеотидных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС со временем и источником их изоляции не выявлено.

Генетические особенности штаммов европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего в Западной и Восточной Сибири

С целью выявления генетических особенностей ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, нами были расшифрованы полногеномные последовательности восьми штаммов. Кроме того, в изучаемую выборку мы также включили четыре штамма из Восточной Сибири – *Sorex 18-10* (KP938507), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *IrkutskBR99-08* (KP331441) (Adelshin R.V., 2015) и один штамм 84.2 из Алтая (HM120875).

При сопоставлении полученных данных с последовательностями, имеющимися в GenBank (всего 140 полногеномных последовательностей, из них 39 – ВКЭ-ЕС), было установлено, что исследуемые штаммы вошли в состав группы ВКЭ-ЕС. При сопоставлении вновь расшифрованных последовательностей между собой оказалось, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири образуют две группы, соответствующие географическому положению мест их изоляции, которые мы условно обозначили как «западносибирский» и «восточносибирский» варианты (Рисунок 3). Длина генома у штаммов западносибирского варианта составила 10 825 нуклеотидов, а у восточносибирского – 10 905. Как и у других известных представителей ВКЭ-ЕС, геномные структуры исследуемых штаммов содержали по 132 нуклеотида в 5'-некодирующей области (100 % гомологии в обеих группах и 3 % различий между группами) и по 10 242 в области, кодирующей полипротеин – предшественник трех структурных и семи неструктурных вирусных белков (> 99,9 % гомологии внутри групп и 99,9 % гомологии между группами). 3'-нетранслируемый участок исследуемых геномов был сопоставим по протяженности и структуре с аналогичной областью штамма *Hyprr* (461 н.о.) и составил для штаммов ВКЭ-ЕС из Западной Сибири 451 н.о., а для штаммов из Восточной Сибири – 531 н.о.

Генетически наиболее близкими к штаммам восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС оказались штаммы из Южной Кореи. Штаммы из Западной Сибири преимущественно группировались со штаммами из Европы. Гомология восточносибирских и западносибирских штаммов с прототипным штаммом ВКЭ-ЕС *Neudoerfl* составила 97,4 и 97,6 % соответственно. Различия по кодирующей части генома в группе Алтайских штаммов не превышали 0,05 % (гомология > 99,9 %). Гомология штаммов из Восточной Сибири составила 99,79–99,9 %. При этом самый высокий уровень различий наблюдался между восточносибирскими штаммами *IG-98* и *IrkutskBR1456-09* и *IrkutskBR99-08* – 0,21 %. Гомология между штаммами, выделенными в 1971 году (*I26-71* и *I18-71*) и штаммом *Sorex 18-10* 2010 года изоляции составила 99,87–99,89 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что на территории Сибири на протяжении как минимум сорока лет циркулирует популяция ВКЭ-ЕС, характеризующаяся высокой степенью стабильности генома.

Нами показано, что вне зависимости от источника выделения, восточносибирский и западносибирский варианты ВКЭ-ЕС однозначно расходятся по сочетаниям аминокислотных замен в 29 позициях в 9 из 10 белков вируса (Таблица 4).

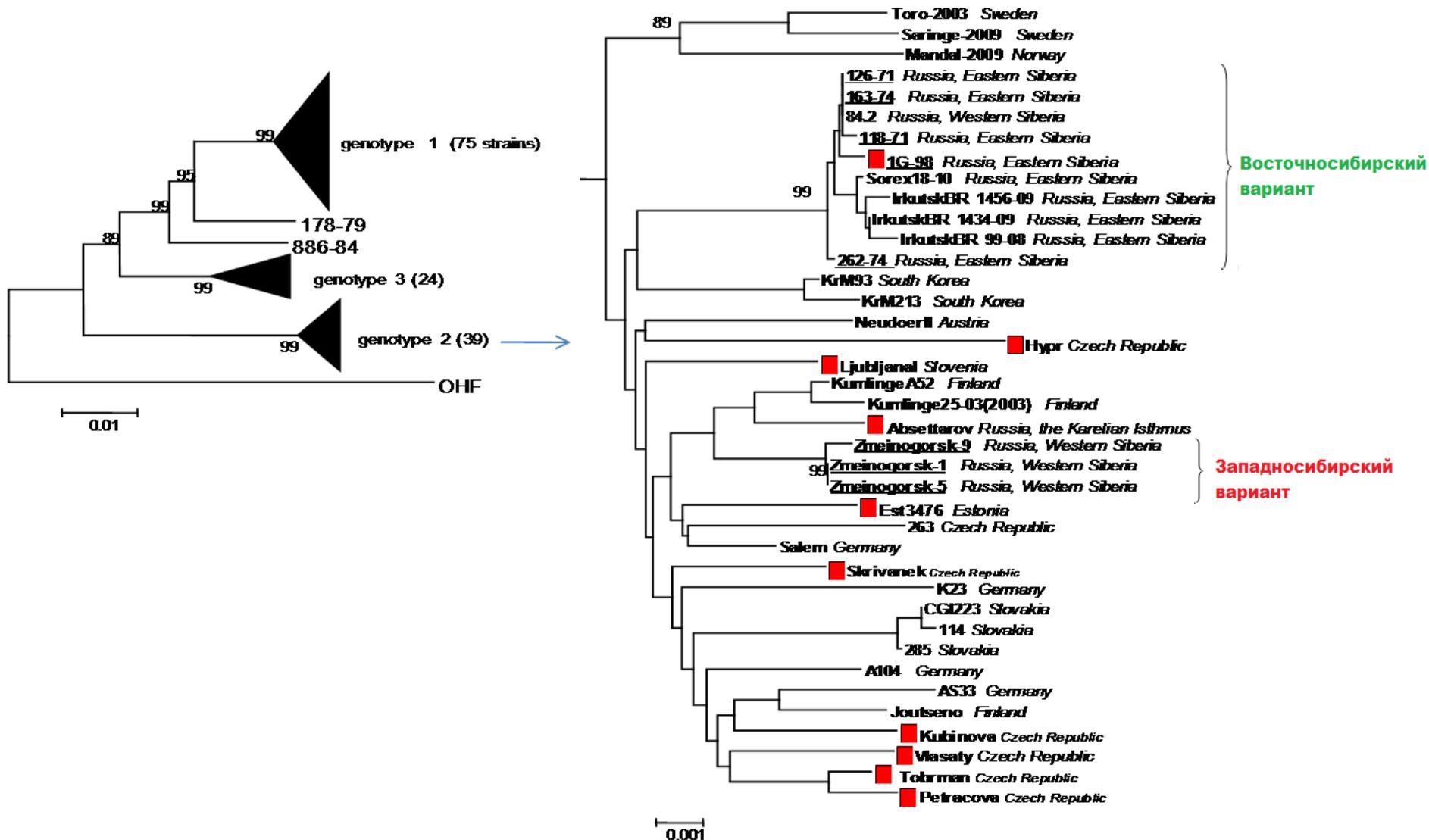


Рисунок 3 – Результаты сопоставления кодирующей области 140 полногеномных последовательностей ВКЭ с помощью компьютерной программы MEGA6 (Tamura K., 2013) методом объединения ближайших соседей с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Штаммы, полногеномные последовательности, расшифрованные в ходе данного исследования, подчеркнуты. Штаммы от больных КЭ людей отмечены красными квадратами

Таблица 4 – Аминокислотные замены у 13 штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири

Позиция	Европейский субтип		Западная Сибирь			Восточная Сибирь									
			Zmeinogorsk-1	Zmeinogorsk-5	Zmeinogorsk-9	84.2	1G-98	118-71	126-71	163-74	262-74	Sorex 18-10	IrkutskBR 1456-09	IrkutskBR 1434-09	IrkutskBR 99-08
C-31	V	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
C-77	K		K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
prM-147	L		L	L	L	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
prM-159	V		A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
prM-163	L		L	L	S	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
E-21	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	I	I	I
E-47	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A	A
E-67	D		D	D	D	D	G	D	D	D	D	D	D	D	D
E-246	A		V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
E-335	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	I	I	I	I
NS1-154	F		L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS1-174	E		E	E	E	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
NS1-237	V		V	V	V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS1-287	T	V	A	I	I	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T
NS1-294	K		R	R	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
NS2A-42	V		I	I	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS2A-53	I	M	I	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS2A-124	S	N	S	S	S	G	E	G	G	G	G	G	G	G	G
NS2A-141	I		I	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS3-33	F	L	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS3-247	R		R	R	R	R	R	K	R	R	R	R	R	R	R
NS3-447	T		T	T	T	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
NS4A-32	H		R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
NS4A-54	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	I	M	M
NS4A-55	V	A	V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
NS4A-121	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	D
NS4A-126	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
NS4B-21	Q	R	Q	Q	Q	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NS4B-56	I		I	I	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS4B-119	L	F	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS4B-250	G		G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G
NS5-101	R	K	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NS5-290	S	N	G	G	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NS5-329	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	F	L	L
NS5-434	H	R	Q	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H
NS5-521	K	R	K	K	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
NS5-699	A	V	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
NS5-701	F	L	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS5-724	A	T	S	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A
NS5-786	V	A	V	V	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS5-897	R	K	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Примечание: в группе ВКЭ-ДВ сопоставлены полипротеиновые структуры 75 штаммов, в группе ВКЭ-Сиб – 24, а в группе ВКЭ-ЕС – 26. Голубым цветом выделены нехарактерные для ВКЭ-ЕС замены; красным цветом – уникальные (штаммспецифические) замены.

Причем в белке E всего одна такая позиция (E₂₄₆). В то же время в двух других позициях этого белка – E₂₁ и E₃₃₅ восточносибирский вариант расходится на два субварианта и, судя по годам изоляции анализируемых штаммов, наблюдается дивергенция сибирской популяции ВКЭ-ЕС. У штаммов из Восточной Сибири с более поздними сроками изоляции в этих позициях валин и треонин заменены на изолейцин (*Val*→*Ile* и *Thr*→*Ile*). Ни одной замены не обнаружено только в белке NS2B, что может быть связано с важной ролью, которую он играет в репродукции ВКЭ.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования впервые описаны генетические особенности ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири. Показано, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири имеют высокую степень генетического сходства со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя группами (линиями) штаммов, обозначенными как восточносибирский и западносибирский варианты.

Характеристика фенотипических свойств штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, изолированных на территории Сибири

Наряду с установлением генетической структуры штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории Западной и Восточной Сибири, мы сочли необходимым оценить их фенотипические характеристики, которые являются важной составляющей полноценного представления о природе и свойствах вируса и имеют большое значение для практической вирусологии.

К фенотипическим признакам, связанным с особенностями внутриклеточной репродукции ВКЭ, относятся: цитопатическая активность, размер и характер бляшек в культуре клеток под агаровым покрытием (S-признак), способность к репродукции при различных температурах (rct- или ts-признак). Оценка S-признака проводили с применением микрометода бляшек в культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) в 24-луночных планшетах. Сведения о бляшкообразующей активности четырех штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Генетический признак S штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа

Штамм	Источник изоляции	Размер бляшек	S-признак
<i>134-71</i>	суслик длиннохвостый	1,5–2,0	–
<i>118-71</i>	суслик длиннохвостый	3,5	+
<i>272-75</i>	полевка узкочерепная	1,5–2,0	–
<i>898-84</i>	красная полевка	3,5–5,0	+

У исследованных штаммов величина бляшек (S-признак) варьировала от 1,5–2,0 до 5,0 мм в диаметре. Штаммы *134-71* и *272-75* образовывали только мелкие бляшки (S⁻-признак) диаметром 1,5–2,0 мм. Штаммы *118-71* и *898-84* в культуре клеток СПЭВ формировали крупные бляшки (S⁺-признак) – 3,5 мм и 3,5–5,0 мм соответственно.

Признак rct₄₂ оценивали по разнице lg титров вируса при культивировании штаммов в культуре клеток СПЭВ при температуре 37 °С и 42 °С. Кроме того, нами был использован генетический маркер терморезистентности (T₅₀), который связан со свойствами белковой оболочки вирионов и обеспечивает устойчивость штаммов к прогреванию. Результаты представлены в Таблице 6.

Результаты определения индекса инактивации штаммов показали, что четыре штамма из пяти были устойчивыми к прогреванию (T₅₀⁺), а штамм *134-71* оказался термолабильным.

В ходе определения способности штаммов ВКЭ-ЕС репродуцироваться при температуре 42 °С было показано, что четыре штамма (*1G-98*, *898-84*, *134-71*, *272-75*) активно размножались при супраоптимальной температуре 42 °С, что свидетельствует об их хороших адаптационных

возможностях. Низкая способность размножаться при данной температуре (rct_{42}^- -признак) отмечена у штамма 118-71.

Таблица 6 – Результаты определения генетических маркеров rct_{37} , rct_{42} и T_{50} штаммов ВКЭ-ЕС

Штамм	Источник изоляции	Генетические признаки				
		IgТЦД 50/мл при 37 °С	rct_{42}		T_{50}	
			разница в IgТЦД 50/мл при 37–42 °С	выраженность признака	индекс инактивации в IgТЦД 50/мл при 37–42 °С	выраженность признака
1G-98	кровь больного	5,0	1,0	+	1,0	+
898-84	красная полевка	4,23	-0,1	+	1,23	+
118-71	суслик длиннохвостый	8,78	3,27	-	1,61	+
134-71	суслик длиннохвостый	8,6	0	+	4,6	-
272-75	полевка узкочерепная	7,0	-0,13	+	1,52	+

Наиболее важны в биологической характеристике вирусов их патогенные свойства. Оценку степени вирулентности штаммов ВКЭ-ЕС проводили по двум показателям: среднему инфекционному титру при заражении беспородных белых мышей массой 5–7 г в мозг (mNіc) и при подкожном заражении (mNsc). Периферическую активность характеризовали индексом инвазивности (И) – разницей титров вируса при интрацеребральном и подкожном заражении мышей, выраженной в Ig LD₅₀/мл. Полученные результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты определения степени вирулентности и индекса инвазивности штаммов ВКЭ-ЕС

Штамм	Источник изоляции	mNіc (lgLD ₅₀ /мл)	mNsc (lgLD ₅₀ /мл)	mNіc – mNsc	И
1G-98	кровь больного	8,72	6,35	2,37	+
898-84	красная полевка	9,32	6,9	2,42	+
262-74	<i>I. persulcatus</i>	10,4	10,1	0,3	+
126-71	<i>I. persulcatus</i>	11,0	8,8	1,2	+
163-74	<i>I. persulcatus</i>	9,5	6,4	3,1	-
118-71	суслик длиннохвостый	10,3	6,6	3,7	-
Змеиногоorsk-1	<i>I. persulcatus</i>	11,5	8,3	3,2	-
Змеиногоorsk-7	<i>I. persulcatus</i>	8,7	5,2	3,5	-

Инфекционное титрование выявило, что четыре штамма ВКЭ-ЕС (1G-98), 898-84, 262-74 и 126-71) характеризовались высокой церебральной и периферической активностью. Два штамма из Восточной Сибири (118-71 и 163-74), а также штаммы Змеиногоorsk-1 и Змеиногоorsk-7 из Западной Сибири характеризовались высокой нейровирулентностью, но низкой периферической активностью.

Дополнительно для характеристики вирулентных свойств штаммов ВКЭ-ЕС, из Восточной и Западной Сибири, были определены такие показатели, как средняя продолжительность жизни (СПЖ) и процент летальности мышей, зараженных интрацеребрально. СПЖ мышей, зараженных

штаммами ВКЭ-ЕС, изолированными на территории Восточной Сибири, варьировала от 4,4 до 6,03 дней, а процент летальности был в пределах от 80 до 100 %.

Показатели продолжительность жизни мышей, зараженных штаммами ВКЭ-ЕС, выделенными на территории Западной Сибири, были аналогичны показателям СПЖ у мышей, зараженных штаммами, изолированными на территории Восточной Сибири. Но эти штаммы обладали более высокой летальностью для лабораторных мышей.

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами отмечено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам.

Нами осуществлен сравнительный анализ последовательностей 3'-некодирующих областей восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. В качестве группы сравнения были взяты штаммы *Neudoerfl* (U27495) (изолирован от клещей *I. ricinus* в 1971 г. в Австрии) и *Hupr* (U39292) (выделен в 1953 г. из крови больного ребенка из Чехословакии) (Wallner G., 1996), а также штаммы ВКЭ-ЕС от больных людей из Чехии в 1953 г. (Formanová P., 2014).

Было установлено, что все исследуемые штаммы из Сибири имеют делецию в варибельной части 3'-некодирующей области генома, сравнимую с таковой у штамма *Hupr*. Размер делеции варьировал. Наиболее протяженная делеция наблюдалась у штаммов, выделенных на территории Западной Сибири (*Змеиногорск-1*, 5, 9). Делецию в варибельной части 3'-некодирующей области имели как высоковирулентные для лабораторных мышей штаммы, так и изоляты, обладающие низкой степенью инвазивности.

Особенности экологии ВКЭ-ЕС на территории Сибири

С целью выявления возможных особенностей экологии ВКЭ-ЕС, циркулирующего за пределами основного европейского ареала, нами получена эколого-географическая характеристика районов изоляции штаммов на территории Сибири. В связи с тем, что выборка исследуемых штаммов была малочисленной и не могла дать объективной информации об особенностях экологии ВКЭ-ЕС в Сибири, то дополнительно в анализ была включена информация о местах изоляции штаммов, данные о которых были получены нами из научных источников. В ходе проведенных исследований было показано, что на территории Западной Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует на территории Алтайского края, Республики Алтай, Новосибирской и Омской областей. В Восточной Сибири ВКЭ-ЕС был изолирован из материала, собранного на территории Эхирит-Булагатского и Иркутского районов Иркутской области и Бичурского района Республики Бурятия. Нами отмечено, что на сегодняшний день Бичурский район является восточной границей России, где выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС.

Анализ эколого-географической характеристики районов изоляции штаммов свидетельствует о том, что на территории Западной и Восточной Сибири ВКЭ-ЕС существует в условиях очаговых экосистем, отличающихся разнообразием климата, рельефа, ландшафтов, флоры и фауны. Климат районов, в которых выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС достаточно суров, варьирует от умеренно до резко континентального, от засушливого до увлажненного. Штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири были изолированы на территориях с различным типом рельефа – от равнин (от 41 м н.у.м.) до среднегорья (выше 2200 м н.у.м.). Районы изоляции штаммов отличаются разнообразием ландшафтов (от степного до горно-таежного).

С целью выявления спектра переносчиков и резервуарных хозяев, способных поддерживать циркуляцию ВКЭ-ЕС на территории Сибири, нами проведен анализ источников изоляции штаммов данного субтипа из разных видов иксодовых клещей и мелких млекопитающих.

Исходя из того, что из 23 штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири 19 были изолированы от таежных клещей, мы высказали предположение, что основным переносчиком и резервуарным хозяином данного субтипа вируса на территории Сибири является клещ *I. persulcatus*. Хотя ВКЭ-ЕС на территории Западно-Сибирского региона обнаружен и в других видах клещей рода *Ixodes*: *I. trianguliceps* и *I. pavlovskyi*, а также в клещах рода *Dermacentor*: *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Полученные результаты опровергают ранее существовавшее мнение о том, что переносчиком ВКЭ-ЕС является только клещ *I. ricinus*, а таежный клещ обладает векторной способностью только в отношении дальневосточного и сибирского субтипов вируса.

На основе собственных данных и анализа источников литературы нами сделано заключение, что циркуляция ВКЭ-ЕС на территории Сибири поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевыми (красно-серая, красная, плоскочерепная, большеухая, узкочерепная, полевка-экономка), а также сусликами (суслик длиннохвостый), насекомоядными (бурозубка), зайцеобразными (алтайская пищуха) и некоторыми видами наземно гнездящихся птиц.

Нами сделано заключение, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, при этом основным переносчиком и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию данного варианта вируса на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы.

Определение эволюционного возраста популяции ВКЭ-ЕС на территории Западной и Восточной Сибири

Для установления эволюционного возраста ВКЭ-ЕС и времени дивергенции западносибирского и восточносибирского вариантов вируса на территории Сибири мы воспользовались моделью SRD06 (Shapiro B., 2006), разделяющей массив генетических данных на 1 + 2 и 3 позицию кодона (два дата сета). Для каждого из двух дата сетов использовалась рекомендованная для этого варианта анализа модель эволюции нуклеотидов НКУ+I+G (Shapiro B., 2006).

Для тестирования возможности датировки филогенетического древа временем изоляции штаммов и выбора наиболее подходящей модели реконструкции эволюционных событий были использованы методы Path sampling и Stepping-Stone sampling (PS / SS) (Baele G., 2012, 2013). Тестирование четырех типов эволюционных моделей показало, что наиболее подходящей для реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС является модель Байесовского скаплота со строгими молекулярными часами и датировкой временем изоляции штаммов (Таблица 8).

Таблица 8 – Выбор модели для байесовского филогенетического анализа ВКЭ-ЕС

Наименование эволюционной модели	Marginal likelihood (предельная вероятность)	
	PS	SS
Байесовский скаплот со строгими часами и датировкой временем изоляции штаммов	-35347.55	-35348.14
Байесовский скаплот со строгими часами, недатированное древо	-35391.39	-35393.09
Байесовский скаплот с ослабленными часами (логнормальные часы) и датировкой временем изоляции штаммов	-35353.82	-35354.63
Байесовский скаплот с ослабленными часами (логнормальные часы), недатированное древо	-35370.36	-35372.57

Примечание: лучшая модель с максимальным значением (с учетом знака) маргинального правдоподобия выделена жирным шрифтом.

Для филогенетических построений нами применялся метод Монте-Карло по схеме марковской цепи (MCMC). В анализе задавалось 100 млн. генераций Марковских цепей, с сохранением результатов каждой 5000 генерации (общее количество деревьев для каждого прогона = 20 000). Значение ESS во всех случаях было более 300.

Для PS/SS анализа задавалось 300 шагов, каждый из которых включал 400000 генераций Марковских цепей. Самое позднее время изоляции штамма ВКЭ-ЕС в нашем исследовании – 2019 г., оно было принято за ноль по временной шкале (следующие оценки tMRCA были представлены в годы до 2019 г.).

Филогенетическое древо, построенное на основании полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС, имевшихся на момент начала наших исследований в базе данных NCBI, представлено на Рисунке 4.

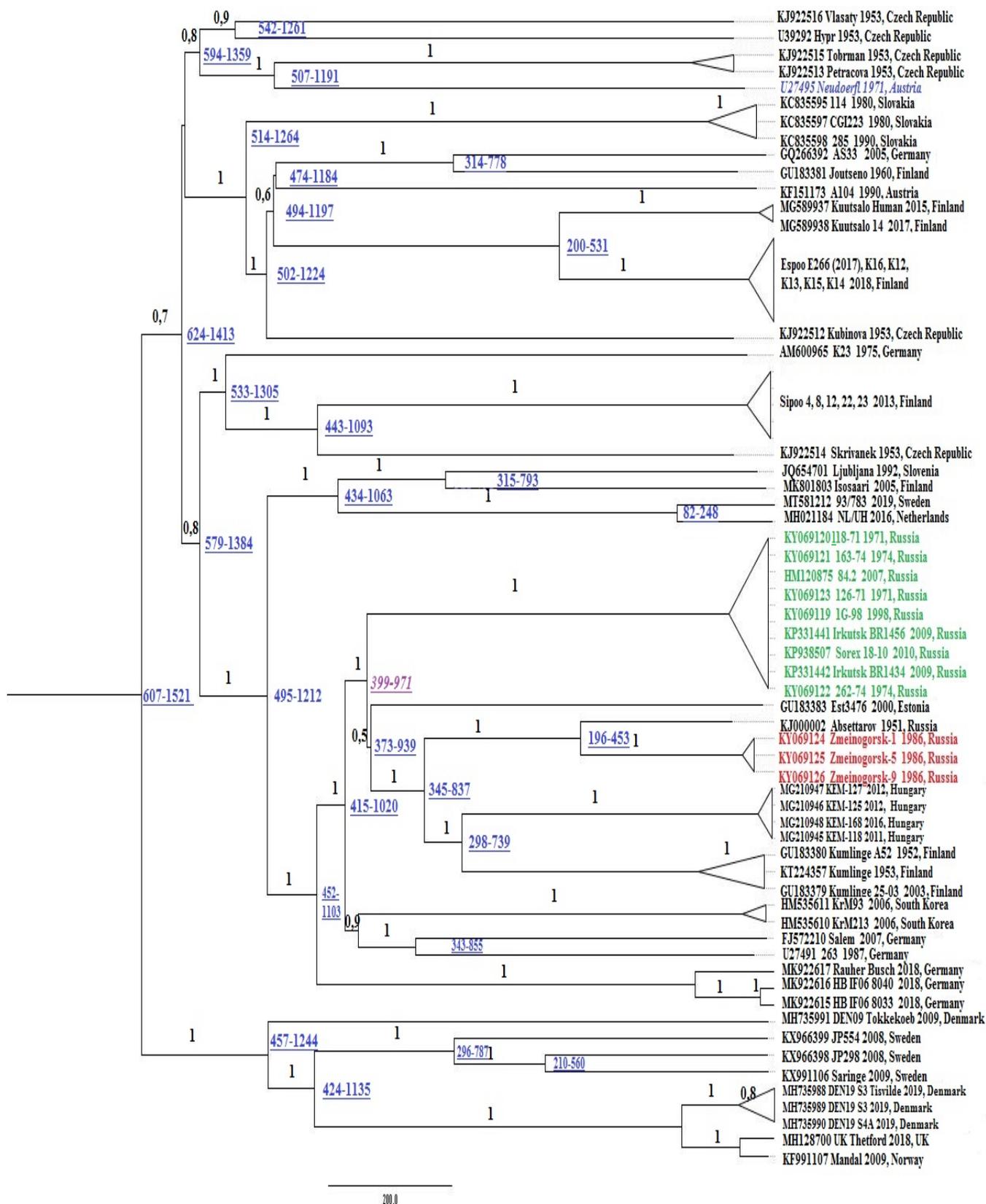


Рисунок 4 – Реконструированное филогенетическое древо ВКЭ-ЕС по эволюционной модели Байесовского скаплота со строгими часами и датировкой временем изоляции штаммов. Шкала показана в годах

На основании филогенетического анализа было установлено, что средняя скорость нуклеотидных замен для штаммов ВКЭ-ЕС составила $1,8 \cdot 10^{-5}$ замен на сайт в год, что согласуется с данными (Uzcátegui N.Y., 2012). Общий предок всех представителей ВКЭ-ЕС возник около 1030 лет назад (tMRCA = 1030; с 95%-м доверительным интервалом (HPD) 607–1521 лет), что

не противоречит данным, полученным Moureau G. и соавт. (Moureau G., 2015). Далее около 964 лет назад ($tMRCA = 964$; 95 % HPD, 624–1413 лет) ВКЭ-ЕС дивергировал на две группы. Первая, наиболее обширная из них, включает в себя штаммы из Европы, России и Южной Кореи, вторую группу образуют штаммы из Северной Европы (Дания, Швеция, Норвегия), а также из Великобритании. $tMRCA$ для клады из первой группы, в которую входят штаммы *118-71*, *163-74*, *84.2*, *126-71*, *1G-98*, *Irkutsk 1456 BR*, *Sorex 18-10*, *Irkutsk 1434 BR*, *262-74* и которую мы в нашем исследовании обозначили как восточносибирский вариант ВКЭ-ЕС, составило около 663 лет (95 % HPD, 399–971). В то время как штаммы, которые в нашем исследовании были отнесены к западносибирскому варианту ВКЭ-ЕС (*Zmeinogorsk-1*, *Zmeinogorsk-5*, *Zmeinogorsk-9*), образовали другую кладу, которая филогенетически является более молодой. $tMRCA$ для нее составило 314 лет (95 % HPD, 196–453).

Полученные нами данные об эволюционной истории ВКЭ-ЕС свидетельствуют о том, что популяция данного варианта вируса имеет множество точек дивергенции и является разновозрастной, что указывает на наличие нескольких этапов заселения им экосистем Евразии, в том числе и Сибири. В общем приближении расселение ВКЭ-ЕС совпадает со временем начала освоения Сибири, при этом процесс заселения переселенцами Верхнего Приобья и предгорий Алтая начался чуть позже, во второй половине XVII века. В связи с этим нельзя исключить влияние на эволюцию ВКЭ-ЕС антропогенного фактора. Однако вряд ли этот фактор является единственным.

ВЫВОДЫ

1. Получена комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Западной и Восточной Сибири. Показано, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири генетически сходны со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Гомология составляет 92–100 %.

2. Сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя группами штаммов – восточносибирский и западносибирский варианты. Эти варианты отличаются друг от друга сочетаниями аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B.

3. Установлено, что кластеризация исследуемых штаммов на дендрограммах в большей степени зависит от территории изоляции образцов, нежели от источника и года изоляции.

4. Отмечено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам. Установлено, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири обладают высокой нейровирулентностью, но часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляет низкую инвазивность.

5. Изучение генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, показало, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, данный вариант вируса может легко приспосабливаться к циркуляции в различных климатогеографических условиях, в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон.

6. Состав основных переносчиков и резервуарных хозяев ВКЭ-ЕС в Сибири имеет свои особенности и существенно отличается от такового на территории Европы. Однако, несмотря на это, гомология штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных в разных точках ареала вируса (от скандинавских стран на западе до восточных границ ареала), гораздо выше, чем степень гомологии у штаммов дальневосточного и сибирского субтипов.

7. С помощью филогенетического анализа выявлено, что дивергенция ВКЭ-ЕС от общего западного предка произошла около 1030 (с 95 % HPD 607–1521) лет назад, а расхождение сибирской линии на два геноварианта (западносибирская и восточносибирская ветви), произошло около 663 лет назад (с 95 % HPD 399–971).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Характеристика вируса клещевого энцефалита Европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири / И. В. Козлова, Т. В. Демина, С. Е. Ткачев, **Ю. С. Савинова** [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 6 (91). – С. 30–40. (ВАК, РИНЦ)
2. **Савинова, Ю. С.** Характеристика штаммов европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Сибири / **Ю. С. Савинова** // 83-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием, посвященная 140-летию со дня рождения профессора Н. Д. Бушмакина, Иркутск, 25-27 апреля 2016 г. – Иркутск, 2016. – С. 348–349.
3. Молекулярно-генетическая и биологическая характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита европейского генотипа, выявленных на территории Западной и Восточной Сибири / С. Е. Ткачев, Т. В. Демина, И. В. Козлова, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, О. В. Сунцова, М. М. Верхозина, Ю. П. Джиоев, А. И. Парамонов, А. Ю. Тикунов, **Ю. С. Савинова** [и др.] // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: Материалы научно-практической конференции, 26-27 сентября 2016 г., Новосибирск. – Новосибирск: Издательство «АРЕАЛ», 2016. – С. 95–97.
4. Особенности экологии вируса клещевого энцефалита Европейского субтипа на территории Сибири / И. В. Козлова, С. Е. Ткачев, **Ю. С. Савинова**, Т. В. Демина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – № 1 (92). – С. 22–25. (ВАК, РИНЦ)
5. Описание штаммов Сибирской популяции ВКЭ Европейского субтипа на основе сопоставления полногеномных структур / Т. В. Демина, С. Е. Ткачев, М. М. Верхозина, И. В. Козлова, В. И. Злобин, **Ю. С. Савинова** // В сборнике: Climate, ecology, agriculture of Eurasia Materials of the international scientific-practical conference. – 2017. – С. 54–62.
6. Распространение генотипов вируса клещевого энцефалита в различных типах ландшафтов Восточной Сибири / М. М. Верхозина, И. В. Козлова, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т. 2, № 5, Ч. 1. – С. 69–75. (ВАК, РИНЦ)
7. Характеристика генетических и фенотипических свойств штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из различных источников на территории Восточной Сибири / М. М. Верхозина, И. В. Козлова, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, Т. В. Демина, С. Е. Ткачев, Ю. П. Джиоев, О. В. Сунцова, **Ю. С. Савинова** [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т. 2, № 5, Ч. 1. – С. 76–82. (ВАК, РИНЦ)
8. Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири / М. М. Верхозина, В. И. Злобин, И. В. Козлова, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, Т. В. Демина, С. Е. Ткачев, Ю. П. Джиоев, О. В. Сунцова, **Ю. С. Савинова**. – Новосибирск: Издательство ФРС «СИБАК», 2017. – 298 с.
9. Tick-borne encephalitis virus strains of Western subtype isolated in Western and Eastern Siberia of Russia: the genetic and biological properties / I. Kozlova, S. Tkachev, Yu. Dzhioev, T. Demina, M. Verkhovina, E. Doroshchenko, O. Lisak, O. Suntsova, **Ju. Savinova** [et al.] // Book of abstracts. ITPD 2017. – September 24-26, 2017. – Vienna, Austria. – P. 121.
10. Определение и описание геномной структуры сибирских штаммов ВКЭ Европейского субтипа / Т. В. Демина, И. В. Козлова, С. Е. Ткачев, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, **Ю. С. Савинова** [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 29 (Scopus, ВАК)
11. The characterization of TBEV of European subtype circulating in Siberia, Russia \ I. V. Kozlova, T. V. Demina, S. E. Tkachev, **Yu. S. Savinova** [et al.] \ Abstracts 16-th Medical Biodefense Conference, Munich, 28-31 October, 2018. – P. 128.
12. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus but does not enhance infection / A. Matveev; I. V. Kozlova, O. V. Stronin, E. K. Doroshchenko, Ya. A. Khlusevich, O. V. Lisak, I. K. Baykov, O. V. Suntsova, L. A. Emelyanova, **Ju. S. Savinova** [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 8, N 14 (4):e0215075. doi:10.1371/journal.pone.0215075. eCollection 2019. (Web of science, Q2)
13. Клещевой энцефалит в XXI веке / И. В. Козлова, **Ю. С. Савинова**, Т. В. Демина, С. Е. Ткачев [и др.]. – Москва: Наука, 2021. – 153 с.

14. Европейский субтип вируса клещевого энцефалита / И. В. Козлова, **Ю. С. Савинова**, Т. В. Демина, С. Е. Ткачев [и др.] // В книге: Клещевой энцефалит в XXI веке. – М., 2021. – С. 153–174.

15. **Савинова Ю. С.** Европейский субтип вируса клещевого энцефалита. Обзор литературы / **Ю. С. Савинова** // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Т. 6, № 4. – С. 100–113. (ВАК, Scopus)

16. **Савинова Ю. С.** Комплексная характеристика вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на территории Сибири / **Ю. С. Савинова** // Журнал инфектологии. – Т. 15, № 1, Прил. 1. – 2023. – С. 143–144.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

HPD	– high posterior density (высокая апостериорная вероятность)
ESS	– effective sample size (эффективный размер выборки)
GGEV	– вирус Греческого энцефалита коз (субтип LIV)
Ile	– аминокислота изолейцин
MCMC	– Monte-Carlo Markov chain (алгоритм Монте-Карло по схеме Марковских цепей)
PS	– path sampling (метод выборки пути, реализованный в программе BEAST)
SS	– stepping-stone sampling (метод ступенчатой выборки пути, реализованный в программе BEAST)
SSEV	– вирус Испанского энцефалита овец
Thr	– аминокислота треонин
tMrCA	– most recent common ancestor (самый недавний общий предок)
TSEV	– вирус Турецкого энцефалита овец
Val	– аминокислота валин
ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ВКЭ-ЕС (TBEV-Eur)	– вирус клещевого энцефалита европейского субтипа
ВКЭ-ДВ (TBEV-FE)	– вирус клещевого энцефалита дальневосточного субтипа
ВКЭ-Сиб (TBEV-Sib)	– вирус клещевого энцефалита сибирского субтипа
ВКЭ-БК (TBEV-Bkl)	– вирус клещевого энцефалита Байкальского субтипа
ВКЭ-Гим (TBEV-Him)	– вирус клещевого энцефалита Гималайского субтипа
КЭ (КВЭ)	– клещевой (вирусный) энцефалит (ТВЕ)
СПЭВ	– перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи
ЦПД	– цитопатическое действие
ШЭО (LIV)	– Шотландский энцефаломиелит овец (louping ill)