

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»  
(ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ)**

*На правах рукописи*

**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**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Научный консультант:  
доктор биологических наук,  
Данчинова Г.А.**

**Иркутск, 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
<b>ГЛАВА 1. Краткая характеристика биологии, разнообразия и циркуляции в природе вируса клещевого энцефалита.....</b>	<b>20</b>
<b>ГЛАВА 2. Краткая характеристика биологии, разнообразия и циркуляции основных клещевых патогенов бактериальной природы.....</b>	<b>40</b>
<b>ГЛАВА 3. Материалы и методы.....</b>	<b>56</b>
<b>ГЛАВА 4. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита, <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>, и альфа-1-протобактерий в Восточной Сибири и Монголии как фактор формирования стабильных популяций микроорганизмов в специфических эколого-географических условиях.....</b>	<b>83</b>
4.1. Генетическая вариабельность ВКЭ.....	84
4.2. Полиморфизм возбудителей клещевого боррелиоза.....	101
4.3. Разнообразие возбудителей клещевого риккетсиоза и близкородственных микроорганизмов пор. <i>Rickettsiales</i> .....	128
4.4. Оценка возможностей экспериментального изучения влияния генетического разнообразия на циркуляцию клещевых патогенов в природе.....	138
<b>ГЛАВА 5. Изучение генетических детерминант ВКЭ, ассоциированных с изменением биологических свойств вируса.....</b>	<b>143</b>
<b>ГЛАВА 6. Изучение влияния генетического разнообразия на циркуляцию ВКЭ в условиях контролируемого эксперимента.....</b>	<b>158</b>
6.1. Сравнение эффективности неvirемической трансмиссии СИБ-ВКЭ и Е-ВКЭ между клещами <i>I. ricinus</i> – специфическими	159

переносчиками Е-ВКЭ.....	
6.2. Конструирование рекомбинантных ВКЭ на основе типовых штаммов Сибирского (Vs) и Западно-Европейского (Hupr) субтипов..	160
6.3. Сравнительная оценка способности рекомбинантных штаммов ВКЭ к репродукции в культуре клеток млекопитающих .....	163
6.4. Сравнительная оценка цитопатического действия ВКЭ и морфология бляшек в культуре клеток СПЭВ.....	166
6.5. Сравнительная оценка физической стабильности вирионов рекомбинантных и контрольных штаммов ВКЭ.....	169
6.6. Сравнительное исследование эффективности неvirемической трансмиссии рекомбинантных штаммов ВКЭ между клещами <i>I. ricinus</i>	172
6.7. Сравнительная оценка эффективности репродукции рекомбинантных штаммов в самках и в нимфах <i>I. ricinus</i> .....	174
6.8. Оценка способности рекомбинантных штаммов ВКЭ инфицировать лабораторных мышей и их патогенные свойства.....	178
6.9. Ассоциации между структурой генома ВКЭ, репликацией вируса в слюнных железах клещей и эффективностью неvirемической трансмиссии между <i>I. ricinus</i> .....	184
<b>ГЛАВА 7.</b>	
<b>Роль генетического разнообразия ВКЭ в обеспечении устойчивой циркуляции вируса в природе.....</b>	<b>188</b>
<b>Заключение.....</b>	<b>201</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>206</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>208</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. - аминокислотный остаток
- 3'НТР - 3' нетранслируемый регион
- 5'НТР - 5' нетранслируемый регион генома вируса клещевого энцефалита
- Е - оболочечный белок ВКЭ
- ргМ - мембранный белок ВКЭ
- R0 - Репродуктивное число инфекции
- Taq-poly - ДНК зависима ДНК полимеразы Taq
- БОЕ - бляшкообразующая единица
- 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
- ИФА - иммуноферментный анализ
- КБ - клещевой боррелиоз
- КЭ - клещевой энцефалит
- МКАТ - моноклональные антитела
- н.о. - нуклеотидное основание
- НВТ - неvirемическая трансмиссия
- ОТ - реакция обратной транскрипции
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РГА - Реакция гемагглютинации
- РНИФ - Реакция непрямой иммунофлуоресценции
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- +РНК - Одноцепочечная РНК положительной полярности
- РНК - одноцепочечная РНК отрицательной полярности

рРНК - рибосомальная РНК

РТГА - Реакция торможения гемагглютинации

С - капсидный белок ВКЭ

СИБ- - Вирус клещевого энцефалита Сибирского субтипа

ВКЭ

СПЖ - средняя продолжительность жизни

СПЭВ - Перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи

ЭТ - Эффективность неvirемической трансмиссии

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследований**

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; Rar 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 C., 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; Hope M, 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.

Высокая актуальность клещевых инфекций обуславливает 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; Knap 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.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **задачи**:

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 исследований**

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 Е и транслированная аминокислотная структура белка Е изолята MNG TBEV-MN-2008 соответствуют ВКЭ линии «886-84», описаны характерные нуклеотидные и аминокислотные замены.

Впервые созданы рекомбинантные штаммы ВКЭ сибирского и европейского субтипов, содержащие гетерологичные структурные гены Е, 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 неvirемической трансмиссии между клещами *I. ricinus*.

Впервые экспериментально доказано, что возникающие при адаптации ВКЭ к организму нового хозяина точечные мутации в критических аминокислотных позициях белка Е 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 неvirемической 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 установлено, что устойчивая неvirемическая трансмиссия ВКЭ возможна только при точном соответствии целого региона генома, кодирующего 5' НТР, капсидный белок С, мембранный белок ргМ и оболочечный белок Е, 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 Е существенно модифицируют патогенетические характеристики ВКЭ, что подтверждается повышенной частотой изоляции вирусов с мутацией Е67D от больных людей и млекопитающих.

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

## Теоретическая и практическая значимость исследований

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 «Клещи» (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.

### **Основные 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 Е приводят к утрате ВКЭ гемагглютинирующей активности, снижению скорости репродукции в культуре клеток млекопитающих, улучшению репродукции в слюнных железах клещей во время питания, повышению эффективности невинемической 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 невинемической 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 невинемической 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 невинемической трансмиссии среди местных популяций клещей и целенаправленное снижение эффективности невинемической трансмиссии приведет к существенному снижению зараженности клещей в природе.

## **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и зарубежных научных конференциях и конгрессах различного уровня, в том числе: 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.

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 71 научная работа, в том числе 31 статья в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук. В зарубежных рецензируемых изданиях опубликовано 9 статей. Имеется 4 свидетельства на регистрацию баз данных, 1 патент и 7 регистрационных удостоверений Федеральной службы по интеллектуальной собственности РФ, 3 патента Республики Монголия (2004, 2007, 2013 гг.).

## **Место выполнения исследований и личный вклад автора.**

Автором лично выработана идея и дизайн исследования, сформулированы цели, задачи, выводы и положения, выносимые на защиту. Также автор выполнил анализ, обобщение и интерпретацию полученных результатов. Автор провел большинство полевых работ в природных очагах клещевых инфекций, лабораторных исследований по определению нуклеотидных последовательностей ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, микроорганизмов порядка *Rickettsiales*. Этот раздел исследования выполнен в совместных исследованиях с сотрудниками лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ» под руководством д.б.н. Г.А. Данчиновой, сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ» под руководством д.м.н. И.В. Козловой, к.б.н. О.В. Строниным (НПО «Вирион», филиал ФГПУ НПО «Микроген», Томск) и к.б.н. Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск), а также с коллективами .

Автором лично разработан и использован метод быстрого направленного мутагенеза флавивирусов с использованием мегапраймеров,

проведено большинство экспериментальных работ по генно-инженерному конструированию рекомбинантных ВКЭ содержащих точечные замены в белке Е, по созданию химерных ВКЭ с заменами структурных генов разных субтипов, а также исследований биологических свойств рекомбинантных ВКЭ в клеточных линиях. Этот этап исследования был выполнен на базе Центра экологии и гидрологии «Оксфорд» NERC (Великобритания) а также на базе Университета г. Ридинг (Великобритания) при проведении совместных исследований с сотрудниками указанных организаций под руководством доктора T.S. Gritsun. Кроме того, на этом этапе исследования проводились совместно с сотрудниками Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН (Москва) проф. В.В. Погодиной, Т.В. Флоровой, Н.Г. Бочковой и Л.С. Левиной.

Экспериментальные работы по невиремической трансмиссии ВКЭ были проведены в рамках совместных исследований Dr. M. Kazimirova и Dr. M. Slovak в Институте зоологии Академии наук Словакии, (Братислава), а также Dr. B. Klempa в Институте вирусологии АН Словакии (Братислава). Автором лично были проведены обработка, анализ и интерпретация полученных на этом этапе экспериментальных результатов.

Исследования проводились при поддержке грантов РФФИ № **08-04-90206-Монг\_а** «Клещевые инфекции – две страны, одна проблема. Ареалы иксодовых клещей и распространение клещевых инфекций на приграничных российско-монгольских территориях» (2008-2009), № **11-04-92221-Монг\_а** «Молекулярно-биологическое разнообразие и сходство переносчиков и возбудителей клещевого энцефалита на сопредельных территориях России и Монголии» (2011-2012), трэвэл-гранта МНТИЦ № с652 (2009г.), гранта Wellcome Trust № **068050** «Genomic characteristics of viruses producing chronic tick-borne encephalitis in experimental animals» (Великобритания, 2004-2005) и гранта BBSRC № **BBS/B/00697** «Development of engineered chimaeric tick-borne flaviviruses to study the molecular basis of virus transmission between co-feeding ticks» (Великобритания, 2006-2008).



## Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, двух глав обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения и выводов, списка литературы. Работа изложена на 255 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 17 таблицами. Список использованной литературы содержит 411 источников, из которых 106 – на русском языке и 305 – на иностранных языках.

### От автора:

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. Стрнину (НПО «Вирион», филиал ФГПУ НПО «Микроген», Томск), к.б.н. Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск) за плодотворное сотрудничество. Автор благодарен А.К. Tuplin, М. Kazimirova, М. Slovak, В.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.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РАЗНООБРАЗИИ И  
РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВИРУСА КЛЕЩЕЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА,  
*BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO* И МИКРООРГАНИЗМОВ  
ПОРЯДКА *RICKETTSIALES*  
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Заболевания, передающиеся человеку при укусах иксодовых клещей (трансмиссивные инфекции), являются серьезной угрозой для здоровья людей, проживающих в эндемичных районах. Ежегодно в Российской Федерации официально регистрируется порядка 3000 случаев заболевания клещевым энцефалитом, 6 000 случаев заболеваний клещевым боррелиозом и 2500 случаев заболевания клещевым риккетсиозом северной Азии. В 2017г., согласно официальным данным Роспотребнадзора, эндемичными по клещевому боррелиозу и клещевому энцефалиту были более 900 административных территорий 76 субъектов федерации [О состоянии..., 2018]. С 2014г. в России на национальном уровне ведется ежегодная регистрация заболеваемости пятью трансмиссивными клещевыми инфекциями – клещевым энцефалитом (КЭ), болезнью Лайма (клещевой боррелиоз, КБ), клещевым риккетсиозом (КР), моноцитарным эрлихиозом (МЭЧ) и гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ), крымской-конго геморрагической лихорадкой (ККГЛ) и астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ) [О состоянии..., 2014; Письмо..., 2014; О состоянии..., 2018]. Экономический ущерб от клещевого боррелиоза только за 2017г составил более 848 миллионов рублей [О состоянии..., 2018]. Возбудители этих заболеваний относятся к разным ветвям жизни и таксономическим группам и привлекают внимание большого количества исследователей во всем мире. Так, в российской информационной системе eLIBRARY.RU в январе 2019г. запрос по ключевым словам «клещевой энцефалит» возвращал 3821 публикаций, из которых 792 релевантных работы были опубликованы в 2016 - 2018 гг [Научная..., 2019]. В базе данных Национальной медицинской библиотеки США PubMed аналогичный запрос «tick-borne encephalitis»

возвращал 4710 публикаций, из которых 466 работ были опубликованы в течение последних трех лет [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>]. Э.И. Коренберг оценивает совокупный объем посвященных КЭ работ советских и российских исследователей в более чем 5,5 тысяч публикаций [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013]. По остальным возбудителям клещевых инфекций проводится сопоставимый объем научных исследований.

Одним из наиболее существенных результатов столь интенсивных исследований стало осознание факта, что одним из ключевых факторов существования клещевых патогенов в природных экосистемах является естественная гетерогенность их популяций [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013г.]. Накопленный к настоящему времени массив описательной информации о генетическом разнообразии возбудителей клещевых инфекций требует изучения, раскрытия и осмысления биологических механизмов, которые обеспечивают как формирование новых вариантов микроорганизмов, так и стабилизацию естественной циркуляции их в природе.

В настоящем обзоре основное внимание уделено двум клещевым инфекциям – клещевому энцефалиту и клещевому боррелиозу (болезни Лайма). С одной стороны, из-за тяжелого течения инфекции у людей, эти заболевания представляют серьезную угрозу для здоровья человека, а с другой стороны, они обладают широчайшим нозоареалом, который охватывает целиком лесную зону умеренного климатического пояса Евразийского континента (клещевой энцефалит) либо все северное полушарие (болезнь Лайма). Кроме того, мы рассматриваем также разнообразие ряда микроорганизмов порядка *Rickettsiales*, которые вызывают менее опасные заболевания, однако их распространение имеет циркумполярный характер, за счет чего их роль в эпидемиологии трансмиссивных инфекций также очень заметна.

## ГЛАВА 1.

### Краткая характеристика биологии, разнообразия и циркуляции в природе вируса клещевого энцефалита

#### Биологическая характеристика ВКЭ.

Вirus клещевого энцефалита (ВКЭ) в настоящее время относят к экологической группе клещевых флавивирусов млекопитающих (Mammalian tick-borne flaviviruses), входящих в род *Flavivirus*, сем. *Flaviviridae* [Index of Viruses..., 2006]. Зрелые вирионы являются сферическими частицами диаметром приблизительно 50 нанометров, содержащие электронно-плотное ядро ( $d=30\text{nm}$ ), окруженное липидной оболочкой [Lindenbach B.D. и др., 2006]. Геном вируса состоит из единственной молекулы одноцепочечной РНК положительной полярности длиной  $\sim 11000$  нуклеотидов. Кодированная часть генома фланкирована 5'- и 3'- нетранслируемыми регионами (НТР), которые выполняют регуляторную функцию в процессах репликации и трансляции. В отличие от клеточных мРНК, вирусная мРНК не имеет полиадениновой последовательности на 3' конце молекулы [Wengler G. и др., 1978]. Геномная РНК упакована в икосаэдрический капсид, сформированный молекулами структурного белка С. Капсид окружен оболочкой из липидного бислоя, в котором закорены димеры структурного оболочечного белка Е («Envelope» - оболочка), ориентированные параллельно мембране вириона, и трансмембранные петли структурного мембранного белка М («Membrane») [Heinz F.X. и др., 2003]. При контакте с поверхностью клетки хозяина белок Е выступает в качестве лиганда с клеточным рецептором. Предполагается наличие множественных рецепторных молекул для ВКЭ, что обусловлено широким спектром позвоночных и беспозвоночных хозяев [Корескú J. и др, 1999; Kroschewski H. и др., 2003]. В качестве кандидатных рецепторов для клещевого энцефалита были показаны ламининсвязывающий белок [Малыгин А.А. и др, 2009],

гепаринсульфат [Kroschewski H. и др., 2003], фибронектин [Maldov D.G., 1992], неизвестный белок 35 кДа [Корескú J, 1999]. Однако до сих пор детальный механизм рецепции ВКЭ не расшифрован. Вход ВКЭ в клетку, предположительно, осуществляется, как и у других флавивирусов, посредством клатрин-зависимого эндоцитоза [Chu, J.J.H., 2004; Yang S., 2013; Peng T., 2009]. Далее повышение кислотности внутри эндосомы до  $\text{pH} = 6,6$  индуцирует необратимую трансформацию белка Е. В результате, 90 димеров белка Е распадаются, а освободившиеся субъединицы формируют 60 шипообразных тримеров, расположенных перпендикулярно мембране вириона. Перестройка белка Е вызывает высокоэффективное слияние клеточной и вирусной мембран. При оптимальной  $\text{pH}$  в диапазоне 5,3-6,2 и температуре  $37^{\circ}\text{C}$  до 70% вирионов сливаются с хозяйской клеткой в течение первой минуты контакта. Однако инкубация ВКЭ в кислой среде до контакта с целевой мембраной блокирует процесс слияния [Corver J. и др., 2000]. Показано, что состав мембраны клетки-хозяина влияет на эффективность слияния, так холестерин, сфингомиелин и олеиновая кислота в составе клеточной мембраны повышают эффективность слияния, а лизофосфатидилхолин ингибирует его [Stiasny K. и др., 2003; Stiasny K. и др., 2004]. Способность белка Е выполнять одновременно функции рецепторного белка и белка слияния достигается за счет наличия трех структурно-функциональных домена: рецепторного, шарнирного и домена слияния [Heinz F.X., 2003; Stiasny K., 2006]. Репликация генома происходит на мембранах перинуклеарного эндоплазматического ретикулума (ЭПР). В течение 3 часов после заражения клетки с геномной +РНК синтезируется дочерняя РНК отрицательной полярности (-РНК) [Lindenbach B.D., Rice. C.M., 2003]. На этом этапе ВКЭ перестраивает мембраны ЭПР в ламинарные паракристаллические везикулярные структуры. Внутри плотно упакованных везикул происходит синтез и хранение двухцепочечных РНК ВКЭ, которые являются основным внутриклеточным маркером вирусной инфекции. В результате дцРНК становится недоступной для цитоплазматических

рецепторов распознавания патогенов, что приводит к задержке активации регуляторного фактора IRF-3 и ингибированию интерферонового ответа клетки [Overby A.K. и др., 2010]. Далее на матрице –РНК происходит множественное копирование РНК со сдвигом интенсивности синтеза в сторону копий +РНК [Chu P.W., Westaway E.G., 1985]. Вторичные копии +РНК используются сразу в трех процессах – транскрипция в -РНК, трансляция полипротеина и упаковка в капсид в качестве генома [Lindenbach B.D., 2003].

С матричной +РНК транслируется единственный полипротеин длиной 3414 аминокислот, который ко- и посттрансляционно нарезается на 3 структурных (С, рrМ и Е) и 7 неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) белков. Белок NS1 это гликопротеин, содержащий два или три сайта гликозилирования. Функции его до сих пор окончательно не выяснены, однако показано, что его гликозилирование необходимо для эффективной секреции, вирулентности и вирусной репликации. NS1 существует в трех формах: как мономер в цитоплазме клетки, как димер в связанном с внутриклеточными мембранами состоянии, а также секретируется как гексамер в межклеточное пространство. Внутриклеточные формы NS1 играют важную, хотя и непонятную, роль в вирусной репликации. Секретируемые и мембранно-связанные формы обеспечивают избегание иммунного ответа хозяина [Rastogi M. и др., 2016; Ruzek D. и др., 2013]. Маленький гидрофобный белок NS2A принимает участие в репликации вирусной РНК и сборке вирусных частиц. Белок NS2B формирует стабильный комплекс с NS3 и является ко-фактором в сериновой протеазе NS2B/NS3 [Lindenbach B.D. и др., 2006]. Крупный белок NS3 обладает мультифункциональной активностью, необходимо как для процессинга полипротеина, так и для репликации РНК. N-терминальная часть белка является каталитическим доменом в сериновой протеазе NS2B/NS3 и разрезает полипротеин на границах между белками NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, и NS4B/NS5. Кроме того, протеаза формирует С-концы зрелого

капсидного белка и белка NS4A [Lindenbach B.D. и др., 2006]. С-терминальная часть NS3 проявляет три активности, связанные с модификацией нуклеиновых кислот – НТФазную, хеликазную, и РТФазную. В качестве НТФазы NS3 проявляет РНК-зависимую нуклеозид трифосфатазную активность, в качестве хеликазы раскручивает цепи РНК при копировании их белком NS5, а в качестве РТФазы дефосфорилирует 5'-конец генома перед добавлением кэпа [Lindenbach B.D. и др., 2006]. Маленькие гидрофобные белки NS4A и NS4B участвуют в формировании репликационного комплекса и способны ингибировать врожденный иммунный ответ клеток хозяина, в частности блокируя сигнального пути интерферонов I типа [Lindenbach B.D. и др., 2006]. NS5 это крупный высоко консервативный белок выполняющий две основные функции – метилтрансферазы и РНК-полимеразы. N-терминальный домен белка способен переносить метильные группы на кэпированные РНК субстраты и участвует в формировании геномной РНК путем модификации 5'-конца молекулы (кэпирование). С-терминальный домен является РНК-зависимой РНК полимеразой (RdPp) и, вместе с белками NS3, NS4A и NS4B формирует репликативный комплекс, обеспечивающий синтез вирусной РНК *de novo* [Lindenbach B.D. и др., 2006].

В ходе ко- и посттрансляционного процессинга полипротеина на мембранах ЭПР происходит разрезание и складывание структурных белков. Белок рgМ выполняет функцию шаперона белка Е, обеспечивая корректное складывание димеров оболочечного белка. В итоге 3 структурных белка и геномная РНК формируют незрелые вирионы, содержащие поверхностный белок рgМ, который предохраняет Е белок от преждевременной необратимой трансформации в процессе формирования вирионов в мембранных структурах клетки. Перед выходом вирионов из клетки, экспонированная на поверхности вириона премембранная часть белка рgМ отрезается клеточной протеазой фурином, и вирион приобретает зрелую форму с оболочкой покрытой димерами белка Е и заякоренным в мембране белком М [Stadler K.,

1997; Lorenz I., 2002]. После этого, зрелые вирионы выходят в межклеточное пространство. Наряду с полноценными зрелыми вирионами зараженная клетка продуцирует вирионоподобные частицы несколько меньшего размера ( $d=14\text{нм}$ ), которые состоят из бислойной липидной оболочки с инкорпорированными белками Е и М, однако не содержат капсида и геномной РНК. Такие частицы обладают полноценной антигенной активностью, однако не являются инфекционными [Lindenbach B.D. и др., 2006].

### **Географическое распространение и внутривидовое генетическое разнообразие ВКЭ.**

Вирус клещевого энцефалита распространен практически по всему Евразийскому континенту и может адаптироваться к целому спектру лесных и лесостепных экосистем умеренной климатической зоны [Злобин В.И., Горин О.З., 1996]. Несмотря на разнообразие природных условий существования и широкий спектр позвоночных и беспозвоночных хозяев, ВКЭ представляет собой достаточно однородную группу вирусов, большинство изолятов вступают в перекрестные иммунные реакции, одинаково эффективно нейтрализуются гипериммунными сыворотками, проявляют сходные культуральные и патогенетические свойства в лабораторных экспериментах [Погодина В.В. и др., 2004; Вотяков]. Согласно современным представлениям, ВКЭ является «...широкораспространенным политипическим видом, которому свойственна значительная географическая и внутривидовая изменчивость» [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013].

Были предприняты многочисленные попытки описать и структурировать ареал распространения ВКЭ в локальном, региональном и глобальном масштабе. На локальном уровне, как правило, проводится картирование отдельных природных очагов КЭ. На региональном уровне проводится районирование более крупных территорий по



распространенности, разнообразию возбудителя и напряженности природных очагов КЭ. В глобальном масштабе географическое распространение рассматривается уже не только с точки зрения локализации вирусных популяций в пространстве и риска заражения людей, но и в эволюционном аспекте в сочетании с филогенетическими данными. Большинство современных вирусологов, на основе различий в первичной структуре генома и сравнительного анализа антигенных свойств, выделяют 3 основных субтипа вируса клещевого энцефалита – Дальневосточный (ДВ-ВКЭ), Сибирский (СИБ-ВКЭ) и Европейский (Е-ВКЭ) [Ecker M. и др., 1999; Злобин В.И. и др., 2001; Gaunt M.W., 2001; Вотяков, 2002; Локтев В.Б. и др., 2007; Gritsun T.S., 2003 и др.]. Различия между субтипами достигают 17% на нуклеотидном уровне и 3,6-5,6 % аминокислотных замен, тогда как изоляты, принадлежащие к одному субтипу, могут быть идентичны на 99 % на нуклеотидном уровне и имеют до 2,2% аминокислотных замен. На фенотипическом уровне субтиповой полиморфизм проявляется наличием специфичного набора 21 маркерных (signature) аминокислотных замен в белке Е, которые коррелируют с антигенными свойствами вирусов. При этом аминокислота, находящаяся в позиции Е206, является уникальной для каждого субтипа ВКЭ [Gritsun T.S. и др., 1995; Ecker M. и др., 1999].

Недавно рядом авторов было предложено выделить два дополнительных субтипа – «Байкальский» и «Тибетский». «Байкальский» кандидатный субтип (типовой штамм 884-86) эволюционно занимает промежуточное положение между ДВ-ВКЭ и СИБ-ВКЭ и обитает на ограниченной территории в Восточной Сибири и Монголии [Джигоев Ю.П., 2012; Демина Т.В., 2012; Козлова И.В. и др., 2012; Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A., 2017]. По нуклеотидной последовательности полипротеина уровень замен между вирусами этой группы и типовыми штаммами трех общепризнанных субтипов составил 12,5% - 15,6%, а по аминокислотной 3,9% - 6,0% с наибольшим сродством к ДВ-ВКЭ. Филогенетические взаимоотношения ВКЭ кандидатного «байкальского» субтипа сближают его скорее с ДВ-ВКЭ

[Карань Л.С. и др., 2007; Джигоев Ю.П., 2012; Демина Т.В., 2012; Козлова И.В. и др., 2012], однако, маркерная замена в белке Е в позиции Е206 соответствует сибирскому субтипу, также как и ряд СИБ-ВКЭ специфичных замен в других частях генома, что в некоторых случаях затрудняет корректную реконструкцию филогении этой группы штаммов ВКЭ [Kovalev S.Y., Mukhasheva T.A., 2017]. По иммунологическим характеристикам эта группа штаммов также занимает промежуточное положение между СИБ-ВКЭ и ДВ-ВКЭ [Козлова И.В. и др., 2012].

«Тибетский» кандидатный субтип (ТИБ-ВКЭ) обнаружен и, по всей видимости, распространен на территории Цинхай-Тибетского нагорья (Китай, Тибет). Вирус обнаружен в результате массового параллельного секвенирования виroma респираторного тракта гималайского сурка (*Marmota himalayana*) зараженность сурков составила 1% - из 200 обследованных животных было получено 2 полных генома ТИБ-ВКЭ. В пределах гена Е, два изолята были идентичны на 99,6% как по нуклеотидной, так и по аминокислотной последовательности. По структуре полипротеина идентичность составила 99,5% и 99,8% соответственно. Об изоляции вируса в культуре или его биологических свойствах авторами сообщено не было [Dai X. и др., 2018].

Популяции ВКЭ, относящиеся к одному субтипу, также отличаются существенным генетическим полиморфизмом. Так, ДВ-ВКЭ подразделяется на генотипы Софьин, Oshima, Shenzang [Leonova G.N., 2013, и др.]. Популяции СИБ-ВКЭ разделяются на 3 генетических типа или линии - Васильченко, Заусаев и Балтийский (ЕК-328) [Gritsun T.S., 2003; Погодина В.В. и др., 2004; Golovljova I., 2008]. Недавно было предложено выделить Обскую генетическую линию СИБ-ВКЭ [Tkachev S.E. и др., 2017]. При анализе генетического полиморфизма СИБ-ВКЭ на Среднем Урале было выделено 18 «кластеронов» - уникальных аминокислотных последовательностей короткого фрагмента гена Е, которые якобы описывают все многообразие форм ВКЭ. Показано, что ВКЭ относящиеся к одному

«кластерону» ассоциированы с определенным типом географического распространения и отражают эволюционный процесс ВКЭ, в связи с чем, предлагается считать «кластерон» минимальной единицей классификации ВКЭ («smallest unit of TBEV classification») [Kovalev S.Y. и др., 2013]. Необходимо отметить, что эти оценки сделаны на основе анализа очень короткого фрагмента гена Е длиной 457 н.о. (152 аминокислотных остатка) а филогенетические реконструкции кластеризации отличаются очень низкой статистической поддержкой каждого «кластерона» - максимум 65%, обычно же менее 50% [Kovalev S.Y. и др., 2009].

Филогеографическая характеристика Е-ВКЭ в Словении была проведена на основе мультилокусного анализа фрагментов генома с использованием двух фрагментов – гена Е длиной 757 н.о. и гена Ns5 длиной 933 н.о. Показано, что Е-ВКЭ в Словении формирует 7 кластеров, которые ассоциированы с местом изоляции. Однако прямой зависимости между генетическими различиями и расстоянием между географическими местами изоляции не обнаружено [Fajs L. и др., 2012].

Многие авторы отмечают, что оценка внутривидового полиморфизма ВКЭ с использованием коротких фрагментов генома приводит к завышенным показателям разнообразия. Такой подход был оправдан на начальных этапах генетических исследований, когда секвенирование представляло трудную техническую задачу, однако на современном этапе более продуктивным представляется изучение полиморфизма ВКЭ на основе полных геномов [см. напр., Belikov S.I. и др., 2014].

Существенный внутривидовой полиморфизм ВКЭ и наличие ряда близкородственных вирусов со схожими биохимическими, антигенными, экологическими и патогенетическими свойствами стимулирует попытки усовершенствовать классификацию и таксономию ВКЭ. В качестве наиболее экстремальных примеров можно привести два диаметрально противоположных подхода. Один из них предполагает разделение существующего вида ВКЭ на три самостоятельных вируса в соответствии с

особенностями клинического проявления инфекции, уровнем сходства нуклеотидных последовательностей и антигенными свойствами в серологических реакциях. Предлагается выделить в качестве новых видов вирус дальневосточного клещевого энцефаломиелита, вирус центрально-европейского клещевого менингоэнцефалита и вирус урало-сибирского клещевого менингоэнцефалита [Вотяков В.И. и др., 2002]. Другой подход напротив, предполагает объединение всех близкородственных вирусов антигенного комплекса клещевого энцефалита в один уникальный вид ВКЭ с образованием 4 вирусных типов - Западный ВКЭ, Восточный ВКЭ, вирус турецкого энцефалита овец и вирус шотландского энцефаломиелита овец. Данное предложение сделано на основе глубокого генетического и филогеографического анализа полноразмерных геномов всего комплекса клещевых флавивирусов и, по мнению авторов, наиболее точно отражает эволюционные, экологические и биогеографические характеристики ВКЭ [Grard G., 2007]. На данном примере видно насколько различаются оценки полиморфизма ВКЭ разными исследователями и насколько востребована углубленная характеристика полиморфизма клещевых флавивирусов и, в частности, ВКЭ.

При том, что разнообразие ВКЭ изучается очень интенсивно, до сих пор остается открытым вопрос о биологическом и экологическом смысле наблюдаемого внутривидового полиморфизма вируса. В первых исследованиях формирование разных субтипов ВКЭ связывали с географической изоляцией возбудителя КЭ или проводили дифференциацию по экологическому принципу, выделяя «рицинусный» и «персультатусный» подтипы ВКЭ в соответствии с ключевым видом клеща-переносчика. Однако по мере накопления информации выяснилось, что далеко не все варианты ВКЭ ассоциированы со специфичным видом хозяина или локализованы в специфичном географическом регионе. Более типичной оказалась ситуация симпатрии двух и более внутривидовых групп ВКЭ. При этом они могут населять одни и те же биотопы, инфицировать одни и те же виды

резервуарных позвоночных хозяев и одинаковые виды клещей. В экспериментальных работах также не было выявлено биологических предпочтений,

### **Циркуляция ВКЭ в природе.**

На самых ранних этапах изучения ВКЭ было установлено, что в природе вирус циркулирует между иксодовыми клещами и млекопитающими мелких и средних размеров. По мере увеличения объема информации выяснилось, что спектр клещей и позвоночных животных, способных заражаться ВКЭ, очень широк, однако не все из них являются компетентными хозяевами ВКЭ.

### *Спектр беспозвоночных хозяев ВКЭ.*

По современным представлениям, иксодовые клещи являются основными долговременными хранителями и переносчиками ВКЭ [Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., 2000]. В течение всего периода изучения ВКЭ вирус был изолирован не менее чем от 18 видов клещей, включая как эпидемически значимые виды *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013; Щучинова Л.Д. и др., 2013; Biernat В. и др., 2014; Ponomareva Е.Р. и др, 2015], так менее опасные для человека *I. pavlovskyi*, *I. trianguliceps*, *I. lividus*, *I. gexagonus*, *I. gibbosus*, *I. ovatus*, *H. japonica*, *H. inermis* [Злобин В.И., Горин О.З., 1996]. Несмотря на это, установлено, что область распространения ВКЭ не выходит за пределы распространения двух видов клещей – *I. persulcatus* и *I. ricinus* [Чунихин С.П., Леонова Г.Н., 1985], которые ситаются основными беспозвоночными хозяевами вируса. Отмечена ассоциация между генетическим разнообразием ВКЭ и видом основного беспозвоночного хозяина. Общепринятым считается что экологически специфичным беспозвоночным хозяином и переносчиком для СИБ-ВКЭ и ДВ-ВКЭ является таежный клещ *I. persulcatus*, а для Е-ВКЭ –

лесной клещ *I. ricinus* [Вотяков В.И. и др., 2002, Mansfield K.L. и др., 2009; Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013]. В лабораторных условиях было показано, что ВКЭ способен эффективно размножаться практически в любых видах иксодовых клещей, в частности, *Rhipicephalus bursa*, *R. appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. marginatum* [Алексеев А.Н., Чунихин С.П., 1992; Romanova L.Iu. и др., 2007], однако неспецифичные виды клещей оказывались плохими донорами вируса [Алексеев А.Н., Чунихин С.П., 1992].

#### *Спектр позвоночных хозяев ВКЭ.*

К настоящему времени ВКЭ был выделен или детектирован более чем в 130 видах позвоночных животных из классов млекопитающих, птиц и рептилий [Злобин В.И., Горин О.З., 1996]. Согласно общепринятым представлениям, позвоночные хозяева могут быть разделены на три группы: резервуарные, индикаторные и случайные [Карпов С.П., 1965; Donoso-Mantke O. и др., 2011 и др.].

К естественным резервуарным хозяевам ВКЭ относят тех животных, которые многочисленны, обладают высокой скоростью обновления популяции, восприимчивы к вирусу, развивают интенсивную вирусемию на длительный период и являются активными прокормителями клещей, в особенности на предимагинальных стадиях [Nosek J. и др., 1970]. В эту группу входит широкий спектр грызунов (рода *Clethrionomys*, *Myodes*, *Apodemus*, *Mus*, *Microtus*, *Micromys*, *Pitymys*, *Arvicola*, *Glis*, *Sciurus* и *Citellus*) [Kořuch O. и др., 1967; Мельникова О.В. и др., 2017], насекомоядных (рода *Sorex*, *Talpa*, *Erinaceus*) [Kořuch O. и др., 1967, и др.] и хищников (*Vulpes*, *Mustela*) [Süss J. и др., 2003; Jemeršić L. и др., 2014; Karabatsos N., 1985].

Насекомоядные и мышевидные грызуны, по всей видимости, могут поддерживать длительную вирусную инфекцию на субвирусемическом уровне в зимний период, поскольку вирусная РНК обнаруживается в мозге и паренхимальных органах этих животных в течение порядка 7 месяцев после

заражения ВКЭ как в полевых наблюдениях [Tonteri E. и др., 2011], так и в эксперименте [Бахвалова В.Н. и др., 2007]. Однако инфекционного вируса, при естественном ходе событий, в обоих исследованиях выявлено не было – признаки инфекционности появлялись только при подавлении иммунитета лабораторных животных и при использовании эксплантов органов. Зараженность резервуарных хозяев ВКЭ в природе варьирует в очень широких пределах, однако обычно составляет 5-10%. Так, в Словении, в течение 19 лет с 1990 по 2009г., зараженность 4 основных позвоночных хозяев ВКЭ *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* и *M. glareolus* составила, в среднем, 2,4%, 3,9%, 9,6% и 12,5% особей соответственно [Кнар N. и др., 2012].

В целом, именно мышевидные грызуны и насекомоядные рассматриваются как основные резервуарные позвоночные хозяева ВКЭ. Экологическая ко-адаптация ВКЭ и его естественных хозяев настолько сильна, что инфекция, как правило, протекает без клинических проявлений и не приводит к ослаблению или гибели животного [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013; Tonteri E. и др., 2013, и др.]. Многие резервуарные хозяева обладают врожденной резистентностью к ВКЭ. Так, при интраперитонеальном заражении ВКЭ европейских лесных мышей *Apodemus sylvaticus* установлено, что у животных развивается системная инфекция, однако вирус был обнаружен только в сыворотке крови и селезенке, но не в головном мозге. Титр ВКЭ в крови достигал 3,2 lg БОЕ/мл на 2 день после заражения, продолжительность системной инфекции составляла 5-6 дней. В отличие от лабораторных белых мышей, *A. sylvaticus* не проявляли признаков заболевания, отличались более длительной, но менее интенсивной (ниже на 1 lg БОЕ/мл в сыворотке крови и в селезенке) вирусемией, более ранней продукцией антител с восьмикратным превышением титров и повышенной активностью лимфоцитов-киллеров (NK-клетки). Также ВКЭ был неспособен размножаться в макрофагах *A. sylvaticus*, однако успешно инфицировал макрофаги белых мышей. Отмечена особая важность

в формировании естественной устойчивости к ВКЭ таких элементов иммунной системы, как специфическая активность макрофагов и НК-клеток и ускоренный синтез специфических антител [Кореску J. и др. 1991].

Для полевой мыши *Apodemus agrarius* минимальная заражающая доза ВКЭ составила 100 БОЕ (или 3 lg БОЕ/мл) как при внутримышечном, так и пероральном заражении. Заражение меньшими дозами (1 или 10 БОЕ) не приводило к развитию инфекции. При любом пути заражения у *A. agrarius* развивалась системная инфекция, происходила выработка нейтрализующих антител, однако в головном мозге ВКЭ обнаруживался только в случае перорального заражения и только при очень высокой заражающей дозе 1500 БОЕ (или 4,2 lg БОЕ/мл). Внутримышечное заражение не приводило к внутримозговой инфекции. Во всех вариантах инфекция ВКЭ проходила бессимптомно. Отмечается важная роль локального врожденного иммунного ответа в месте инокуляции в элиминации низких заражающих доз ВКЭ [Egyed L. и др., 2015].

Дополнительные (или индикаторные) хозяева регулярно бывают инфицированы ВКЭ в естественных условиях, однако развивают кратковременную виремию с низкими титрами вируса, вырабатывают стойкий иммунный ответ и не способны передавать ВКЭ незараженным клещам. У собак при заражении ВКЭ развивается короткая виремия с низкими концентрациями инфекционного вируса в крови. Крупные копытные — олени, косули и лоси — также обычно рассматриваются в качестве вторичных индикаторных хозяев ВКЭ. В России среди благородных оленей до 94% особей может иметь антитела к ВКЭ в высоких титрах, что свидетельствует о регулярном контакте этих животных с вирусом. При этом, порядка половины животных может быть поражено нимфами и имаго таежного клеща [Коренберг Э.И. и др., 1975]. Тем не менее, эти животные не могут поддерживать неvirемическую трансмиссию, не развивают высоких титров вируса в крови, а инфекция ВКЭ у копытных может протекать в форме тяжелых неврологических расстройств [Tonteri E. и др., 2016].



Роль птиц в циркуляции ВКЭ неоднозначна. С одной стороны в литературе утвердилось мнение о высокой роли птиц в поддержании природных очагов ВКЭ и даже в диссеминации вируса [Ruzek D., и др. 2013; Злобин В.И., Горин О.З., 1996]. Приводятся данные об изоляции штаммов ВКЭ от рябчика, серой утки, широконоски [Трухина А.Г., 1989], конька лесного, овсянки обыкновенной, дрозда-рябинника [Федоров В.Г., 1973], рябчика, овсянки обыкновенной, лесного конька, зяблика, юрка, скворца обыкновенного, дрозда-рябинника [Столбов Н.М., Билалова Э.З., 1970]. В окрестностях г. Томск в 2014г. РНК ВКЭ была обнаружена у более 42% из 316 птиц. Среди «зараженных» были не только виды лесных местообитаний (главным образом дрозд-рябинник), но также синантропные птицы (сизый голубь, полевой воробей) и даже птицы водной и околоводной групп (гусеобразные, кулики, ласточка-береговушка) [Москвитина Н.С. и др., 2014]. В экспериментальных условиях у диких уток развивается интенсивная виремия, в титрах достаточных для вирусемической трансмиссии ВКЭ клещам [Tongeren H.A.E., 1983] а также персистентная инфекция [Ernek E. и др., 1969]. Всего на настоящий момент описано порядка 150 видов птиц, от которых был изолирован ВКЭ или у которых обнаруживались антитела к этому вирусу [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013].

С другой стороны, целый ряд авторов сообщает о низком уровне зараженности птиц ВКЭ, малом уровне иммунной прослойки и не отводят птицам существенной роли в поддержании циркуляции ВКЭ. Так, в Восточной Сибири, при исследовании 2442 особей зараженность ВКЭ составила 0,5% а антитела к ВКЭ обнаружены у 2,1% птиц. На основе анализа полученных результатов авторы делают заключение о том, что роль птиц в обеспечении трансмиссии ВКЭ не является определяющей и преувеличена [Злобин В.И., Горин О.З., 1996]. На Дальнем Востоке, при обследовании 935 особей птиц, ВКЭ в тканях обнаружен не был, а антитела к ВКЭ были выявлены у 0,8-1,2% особей. При этом, серопозитивны были только птицы, относящиеся к видам лесных наземных и травянисто-

кустарниковых экологических групп. Среди птиц водного и околоводного комплекса антител к ВКЭ не выявлено, так же как и среди хищных птиц [Кисленко Г.С. и др., 1992]. В Красноярском крае, при обследовании 377 обследованных птиц лесного наземного и травянисто-кустарникового комплекса также не было выявлено зараженности ВКЭ, а антитела к ВКЭ обнаруживались в среднем у 2,2% птиц. Наибольшая частота контактов с ВКЭ была отмечена для рябчика, чернозобого дрозда, овсянки-ремеза и соловья-красношейки. Параллельные исследования клещей и мышевидных грызунов в этих же природных очагах показали, что роль птиц в циркуляции ВКЭ в Средней Сибири весьма ограничена, если вообще существует [Кисленко Г.С. и др., 1993]. По мнению Э.И. Коренберга, посвятившего этой проблеме несколько обширных исследований, несмотря на то, что птицы регулярно контактируют с ВКЭ, до сих пор получено чрезвычайно мало прямых доказательств их участия в процессах диссеминации и циркуляции вируса. Пернатые, по всей вероятности, могут быть лишь дополнительными хозяевами ВКЭ [Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С., 2013].

Случайными хозяевами обычно считают животных, которые могут быть инфицированы ВКЭ в природе или в лабораторных условиях, однако в силу физиологических или экологических особенностей являются тупиком для вируса и не принимают существенного участия в его циркуляции [Карпов С.П., 1965; Nosek J. и др., 1970]. По всей видимости, случайными хозяевами являются рукокрылые и пресмыкающиеся, которые поддерживают репродукцию ВКЭ в лабораторных экспериментах, однако в природе не являются ни основными прокомителями клещей, ни естественными хозяевами ВКЭ. Человек также является типичным примером случайного хозяина ВКЭ.

*Циркуляция ВКЭ между зараженными и незараженными хозяевами, вертикальная трансмиссия, виремическая трансмиссия, невиремическая трансмиссия.*

Согласно современным представлениям, ядром природного очага ВКЭ, обеспечивающим его существование, являются основные резервуары вируса – иксодовые клещи и прокормители преимагинальных стадий и резервуарные хозяева вируса – мышевидные грызуны и насекомоядные [Карпов С.П., 1965]. Термин «вертикальная трансмиссия» в применении к клещевым инфекциям объединяет два процесса – с одной стороны передачу микроорганизмов от самки потомству (трансовариальная передача), а с другой стороны сохранение инфекции в процессе метаморфоза одной и той же особи клеща (трансфазовая передача) [Коренберг Э.И., 2013]. Трансовариальная передача ВКЭ осуществляется с низкой эффективностью независимо от субтипа вируса, а эффективность трансовариальной передачи напрямую зависит от концентрации инфекционного вируса в самке. Показано, что концентрация ВКЭ в самках 6-7 lg LD<sub>50</sub> обеспечивает 100% эффективность трансовариальной трансмиссии, тогда как при 3 lg LD<sub>50</sub> трансовариальной передачи не наблюдалось [Чунихин С.П., Леонова Г.Н., 1985]. Трансфазовая передача вируса также сопряжена с большими потерями инфекционного вируса в популяции клещей.

Недавно было экспериментально показано, что в условиях естественного заражения исходных клещей, при трансфазовой передаче ВКЭ от личинок *I. ricinus* к нимфам зараженными остаются только 0,8% клещей, а при передаче от нимф к имаго – 8,5%. В данном случае, процесс трансфазовой передачи зависел от концентрации вируса и способа заражения исходных клещей. Так, концентрация инфекционного ВКЭ в одной нимфе после невиремической трансмиссии составляла в среднем 100 БОЕ, при этом эффективность трансмиссии ВКЭ от нимф к имаго была 8,5 процентов. Однако, при заражении нимф клещей инокуляцией стандартной дозой ВКЭ в 100000 БОЕ, эффективность трансфазовой трансмиссии в имаго достигала в

среднем 96,2 процента. В целом авторы оценили эффективность трансфазовой передачи ВКЭ от личинок к нимфам в 0,8%, а от нимф к имаго в 14% [Slovák M., 2014]. Советские и российские авторы традиционно оценивают трансфазовую передачу ВКЭ как высокоэффективную.

Виремическая трансмиссия является одним из первых описанных способов передачи ВКЭ. Отсекающий титр ВКЭ в крови, при котором вирус может заразить питающегося клеща, составляет 2 - 2.5 lgLD<sub>50</sub>/0,03 мл. [Radda A. и др., 1969; Chunikhin S.P., 1979].

Сравнительно недавно на модели «вирус Thogoto – клещ *Rhipicephalus appendiculatus* – морская свинка» был описан еще один механизм трансмиссии клещевых патогенов, не требующий развития системной инфекции и циркуляции патогена в крови позвоночного животного [Jones L.D., 1987]. В отечественной литературе этот механизм традиционно обозначается двумя терминами: «дистантная передача» что означает передачу при совместном питании на животном без виремии, и «трансптиальная передача» обозначающий передачу возбудителя инфекции при питании клещей в пределах одного очага воспаления на авиремийном животном [Алексеев А.Н., 1990; Алексеев А.Н., 1992]. При этом отсутствуют экспериментальные или фактические данные о наличии фундаментальных различий между этими процессами. В зарубежной литературе для обозначения этого механизма трансмиссии клещевых патогенов используются термины «co-feeding transmission» («передача при совместном питании»), или «non-systemic transmission» («несистемная трансмиссия»). Оба термина означают передачу возбудителя при совместном питании клещей в непосредственной близости друг от друга на прокормителе без выраженной виремии\бактеремии. Поскольку в данной работе исследуются как ВКЭ, так и бактериальные патогены, в тексте, наряду с термином «невиремическая трансмиссия» используется более общий термин «несистемная трансмиссия». Этот термин, на наш взгляд, отражает главное свойство этого механизма горизонтальной трансмиссии - отсутствие

необходимости в развитии системной инфекции и виремии\бактеримии у позвоночного хозяина и прокормителя клещей – и может быть использован в качестве равнозначного синонима.

Довольно быстро после открытия, несистемная трансмиссия была обнаружена и в циркуляции других клещевых микроорганизмов, в частности ВКЭ [Галимов В. Р., 1989]. Ключевой характеристикой этого механизма передачи является локальное размножение вирусов и бактерий непосредственно в месте укуса клеща с использованием эпителиальных клеток, мигрирующих дендритных клеток и др. клеточных элементы кожи. Размер локального очага кожной инфекции составляет порядка 1-2 см. Несистемная трансмиссия ВКЭ происходит довольно быстро и занимает от нескольких минут до 16-24 часов. При этом заражение неинфицированного клеща происходит при питании в непосредственной близости от клеща – источника инфекции за счет поглощения инфицированных форменных элементов крови и межклеточной жидкости.

Данный механизм не требует размножения и длительной циркуляции вирусов и бактерий в кровяном русле позвоночного хозяина. Это с одной стороны увеличивает эффективность передачи микроорганизмов, а с другой расширяет количество компетентных хозяев за счет возможности передачи при прокормлении клеща даже на высокоиммунном хозяине – в локальном кожном сайте инфекции вирусы и бактерии выведены из-под действия иммунной системы позвоночного. Доказана существенная эпидемиологическая значимость данного механизма трансмиссии, Продemonстрировано, что даже при исключении всех остальных способов передачи, ВКЭ сможет существовать в природе только за счет несистемной трансмиссии [Labuda M. и др., 1993<sup>1</sup>; 1993<sup>2</sup>; 1997]

## **Клинические проявления КЭ и эпидемиологическое значение разнообразия возбудителя.**

При укусе клеща вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) формирует локальный очаг инфекции в месте укуса. После этого вирус распространяется в региональные лимфатические узлы, где репродуцируется до детектируемых значений. На этом этапе инфекции характерна выраженная антигенемия и виремия. При этом до 80% случаев инфекции протекают без выраженных клинических проявлений либо с минимальными нарушениями здоровья. Сероконверсия происходит при любом течении инфекции, что обуславливает наличие естественной иммунной прослойки. Иммуноглобулины М (IgM) вырабатываются в первые 2-7 дней после заражения и могут циркулировать в крови до 10 месяцев [Hofmann H., 1983, Борисов В.А., 2002], иммуноглобулины G (IgG) появляются в крови больного через 7-14 дней болезни и достигают максимальных значений в период реконвалесценции (4-5 неделя), сохраняя стабильный уровень до 64 дня болезни [Борисов В.А., 2002]. Клинические проявления инфекции неспецифичны и отличаются широким полиморфизмом. Поэтому до сих пор нет общепризнанной классификации клещевого энцефалита [Борисов В.А., 2002]. В европейской части нозоареала инкубационный период составляет в среднем 8 дней, варьируя от 4 до 24 дней после укуса клеща [Kaiser R., 1999]. В Российской Федерации отмечена широкая вариабельность продолжительности инкубационного периода, который может составлять от 1 до 68 суток, в среднем составляя 7-14 дней при заражении через укус клеща и 2-3 дня при заражении алиментарным путем [Борисов В.А., 2002]. У 72 – 87 % пациентов в Западной Европе КЭ протекает в форме двухволновой лихорадки. Первая стадия длится 1-8 (в среднем 5) дней с выраженными симптомами лихорадки (у 99 % пациентов), слабости (63 %), общего недомогания (62 %), головной и мышечной боли (54 %) [Kaiser R. 1999; Mickiene A. и др, 2002]. В большинстве случаев, на этом этапе происходит сероконверсия но дальше инфекция не развивается. Однако в 5 - 30% случаев после ремиссии

продолжительностью 2-7 дней развивается вторая фаза заболевания, которая характеризуется резким началом, лихорадкой, неврологическими и менингеальными признаками. На этой стадии выделяют 5 основных форм болезни – лихорадочную, менингеальную и очаговую. Очаговая форма в свою очередь подразделяется на менингоэнцефалитическую, полиомиелитическую и полирадикулоневротическую формы [Борисов В.А., 2002]. Отмечены некоторые различия в клинических характеристиках инфекции разных субтипов и более мелких генетических групп ВКЭ [Леонова Г.Н. и др., 2002].

Замечено, что риск заражения ВКЭ и заболеваемость КЭ слабо коррелируют с эпизоотическим циклом, однако во многом определяются социальными факторами. Этот эффект наблюдается как в долговременном интервале так и в пределах одного сезона. В долговременном интервале, динамику заболеваемости КЭ определяют такие показатели как форма и интенсивность хозяйственного использования лесных экосистем, уровень рекреационной активности населения, а также особенности организации медицинской службы по диагностике КЭ. В коротковременном интервале (в пределах одного сезона), наибольшее влияние имеют локальные изменения погодных условий, определяющие манеру рекреационной и хозяйственной активности людей. При этом, такие эпизоотические факторы как обилие, численность либо вирусофорность клещей оказывает очень слабое влияние на заболеваемость КЭ [Sumilo D. и др. 2007; Randolph S.E., 2010]. Выявлена положительная ковариационная связь с задержкой в один год между повышением численности косуль (*Capreolus capreolus*), благородных оленей (*Cervus elaphus*), и зайцев (*Lepus timidus*, *Lepus europaeus*) и ростом заболеваемости КЭ. Численность лося (*Alces alces*) и лани (*Dama dama*) имела отрицательную ковариационную связь, тогда как численность кабана (*Sus scrofa*), рыси (*Lynx lynx*), лисицы (*Vulpes vulpes*) не коррелировала с изменениями заболеваемости. Температурные показатели окружающей среды, в частности, годовой период вегетации, годовая сумма температур,

ежегодная средняя температура и отклонение ежегодных средних температур также не коррелировали с изменениями заболеваемости. [Jaenson T.G.T. и др., 2018]. Отмечена статистически значимая корреляция между заболеваемостью и степенью генетического разнообразия популяции ВКЭ в природе, а также заболеваемостью и уровнем инфекции ВКЭ среди мышевидных грызунов – прокормителей клещей [Морозова О.В., 2010].

## ГЛАВА 2.

### **Краткая характеристика биологии, разнообразия и циркуляции основных клещевых патогенов бактериальной природы**

#### ***2.1. Borrelia burgdorferi sensu lato***

В соответствии с действующей в настоящее время "Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем" - МКБ-10 (МКБ - 10, 1999) заболевание вызываемое *B. burgdorferi sensu lato* получило наименование «A69.2 Болезнь Лайма». В нашей стране инфекция впервые была серологически верифицирована в 1985 г. у пациентов клиники Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР [Коренберг Э.И. и др., 1988]. В 1991г. это заболевание включено в официальный перечень нозологических форм, имеющих в России, под названием "клещевой боррелиоз (болезнь Лайма)" (КБ).

Примерно у 70% пациентов заболевание начинается с появления мигрирующей эритемы диаметром не менее 5см. По мере развития инфекционного процесса эритема может увеличиваться в размерах или перемещаться на другие части тела. В острой фазе заболевание протекает в форме неспецифической лихорадки с гриппоподобными симптомами. При отсутствии корректного лечения заболевание переходит во вторую стадию - развиваются осложнения в форме Лайм-артритов, дерматитов, перикардитов и др. Во многих случаях заболевание сопровождается поражением нервной



системы в форме менингоградикулонеурита, менингита, энцефалита. В этом случае болезнь может быть ошибочно идентифицирована как КЭ.

Далеко не все виды комплекса *B. burgdorferi sensu lato* являются патогенными для человека. Доказана патогенность 3 геновидов: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* и *B. afzelii* [Postic D. 1994; Baranton, G., 1992; Canica, M.M., 1993; Busch, U., 1996]. Клинические проявления боррелиоза весьма разнообразны и, возможно, основаны на генетической гетерогенности боррелий, так, например, у больных с неврологическими проявлениями чаще выявляется *B. garinii* [Wang G, et al., 1999]. Однако прямой зависимости между видом возбудителя и клиническими симптомами заболевания на сегодняшний день не выявлено. Для диагностики ИКБ в настоящее время широко применяют серологические методы. Антитела при боррелиозной инфекции вырабатываются более чем к 20 антигенам, кодируемым генами как хромосомы (белки BmpA, флагеллин, P58, P66, P83/100 и др.), так и внехромосомных плазмид (OspA, OspB, OspC, OspE, OspF, Osp17, VlsE и др.). Состав белков-антигенов и их соотношение могут значительно отличаться не только среди боррелий разных видов, но также в изолятах одного вида [Hauser U. et al., 1998, 1999]. В связи с такой высокой вариабельностью генома и кодируемых им антигенов, изучение генетической вариабельности боррелий имеет большое значение для разработки эффективных средств диагностики.

### **Биология *B. burgdorferi sensu lato***

Возбудители КБ относятся к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду *Borrelia*. В 1982 году Willy Burgdorfer и Alan Barbour выделили от пациента с болезнью Лайма неизвестную спирохету [Burgdorfer W., 1982]. В 1984 году R. Johnson установил принадлежность выделенного возбудителя к роду *Borrelia*, Swellengrebel 1900; (порядок Spirochaetales, Buchanan 1917; семейство Spirochaetaceae, Swellengrebel 1907) [Johnson R.C., 1984]. Новая бактерия получила название *Borrelia burgdorferi*, однако вскоре

обнаружилось, что на генетическом уровне этот вид более гетерогенен, чем это казалось сначала. К настоящему времени по различиям в первичной структуре генома вид *B. burgdorferi* разделен на 15 валидных и 5 кандидатных видов боррелий, которые объединяют в комплекс *B. burgdorferi sensu lato* [Baranton, G., 1992; Fukunaga M., 19962; Postic, D., 1998; Wang, G. 1997]. Все эти виды имеют распространение на территории России (преимущественно *B.garinii* и *B.afzelii*). Все известные виды рода *Borrelia* морфологически весьма сходны. Это грамотрицательные спирохеты, относительно легко окрашивающиеся анилиновыми красителями, что отличает их от других родов спирохет. Длина микробной клетки - от 10 до 30 мкм, поперечный размер составляет 0,20-0,25 мкм. По форме представляют собой извитую, лево- или правовращающуюся спираль [Barbour A.G., 1986]. Размеры и форма микроорганизма могут изменяться в зависимости от условий существования в разных хозяевах, при культивировании на питательных средах и под действием антибиотиков [Barbour, A.G., 1986]. В геноме боррелий отсутствуют гены, кодирующие синтез аминокислот и жирных кислот, ко-факторов и нуклеотидов. Кроме того, у боррелий нет генов, кодирующих дыхательную цепь фосфорилирования - они хемоорганотрофные анаэробы. Поэтому они должны получать энергию для синтеза АТФ от субстрата фосфорилирования, который имеется только в цитоплазме других клеток. Боррелии также испытывают недостаток других ферментов, необходимых для цикла трикарбоновых кислот и фосфорилирования. Таким образом, способность их собственных компонентов метаболизма настолько ограничена, что существовать (причем с преимущественным внутриклеточным персистированием) они могут только в организме хозяина, который гарантирует доступность готовых питательных веществ. Вследствие этого, культивирование боррелий требует сложных многокомпонентных сред, обогащенных аминокислотами, витаминами, альбумином бычьей и кроличьей плазмы и другими веществами (модифицированная среда BSK-II). Температурный оптимум

культивирования составляет 30-34°C. Боррелии отличаются длительным и непостоянным периодом роста на питательных средах в анаэробных условиях, который обычно составляет 7-20 часов. При достижении числа  $10^6$  -  $10^8$  микробных клеток в мл возможно осуществление дальнейших лабораторных исследований. Боррелии, выращенные в среде культивирования, хорошо сохраняются при низких температурах (-70°- 90°C) до нескольких лет, не теряя своих биологических свойств. Формалин, фенол, этиловый спирт и другие дезинфицирующие вещества, а также ультрафиолетовое излучение обладают инактивирующим действием на боррелии [Hayes S.F., 1993; Kraiczy P., 1999].

Геном боррелий содержит одну сравнительно небольшую (порядка 900 000 н.о.) линейную хромосому и до 20 кольцевых и линейных плазмид, известных еще под названием микрохромосомы [Barbour A.G., 1988; Fraser, C.M., 1997; Kraiczy P., 1999]. В результате, порядка половины генома боррелий кодировано в линейных и кольцевых плазмидах, что выделяет их среди других микроорганизмов [Casjens S., 2000]. Количество и размер плазмид значительно варьирует даже среди отдельных изолятов одного вида боррелий [Barbour A.G., 1986]. Следующей особенностью боррелий является то, что плазмиды обнаруживаются преимущественно при первичной изоляции штаммов в культуре, последующие пересевы приводят к уменьшению их числа и даже полной элиминации, в связи с чем, изменяется и антигенный профиль возбудителя, приводящий к полной потере инвазивности [Xu Y., 1996].

Антигенный спектр боррелий весьма вариабелен и может различаться не только у боррелий разных видов, но и среди изолятов одного вида [Wang I.N., 1999]. Боррелии имеют несколько основных групп антигенов: поверхностные (OspA, OspB, OspD, OspE и OspF), жгутиковый (p41) и цитоплазматический. Поверхностные антигены являются основными иммуногенами и характеризуются вариабельностью. Наибольшая их гетерогенность обнаруживается у *B.garinii* и *B. afzelii*. Штаммы *B.burgdorferi*

s.s. отличаются относительным постоянством спектра поверхностных белков [Wilske B., 1996; Wilske B., 1993]. Многие антигенные детерминанты внешней оболочки сходны с таковыми у боррелий других геновидов и даже некоторых бактерий. Этим объясняется возможность перекреста в иммунологических реакциях. [Magnarelli L.A., 1990; Magnarelli L.A., 1995]

В настоящее время установлены и достаточно хорошо изучены и некоторые другие антигены боррелий: p83/100, Oms66 (p66), BmpA (p39), HSP60 (p60), p18, OspD, p41 [Hauser U., 1998; Skare J.T., 1997] Генетическая информация о большинстве из них кодирована в плазмидной части генома, поэтому, потеря отдельных плазмид, например, при длительной персистенции боррелий в организме человека, обязательно влечет за собой и изменение структуры поверхностных антигенов, а значит и иммунного ответа [Barbour A.G., 1985].

### **Видовое и генетическое разнообразие *B. burgdorferi sensu lato***

Изначально всех боррелий выявленных в иксодовых клещах относили к одному виду *B. burgdorferi* [Johnson R.C., 1984]. Однако, по мере совершенствования методов идентификации бактерий выяснилось, что, несмотря на кажущуюся биологическую униформность, на генетическом уровне этот вид полиморфен. Поэтому таксономия боррелий была изменена, и представители *B. burgdorferi* с наиболее своеобразными структурами геномов получили статус “геновидов”. Со временем все эти боррелии были объединены в комплекс *B. burgdorferi sensu lato* при этом большинство геновидов получили статус валидных видов.

Вследствие существенной морфологической и антигенной униформности, для оценки разнообразия *B. burgdorferi sensu lato* используют главным образом генетические данные. Наиболее популярными для сравнительного анализа являются локализованные в хромосоме гены рибосомального кластера - 16S рибосомальной РНК (rrs) а также спейсера между tandemными повторами генов 5S и 23S рибосомальных РНК (rrfA-rrlB) [Fukunaga M., 1996; Postic D., 1994]. Анализ этих последовательностей

позволяет однозначно идентифицировать вид боррелий. Кроме того, для внутривидовой характеристики используют гены флагеллина (flaA, flaB), поверхностных антигенов (OspA, OspC, p66, VlsE и др.) [Qiu W.G., 2002; Bunikis J., 1996; Wang I.N., 1999]. С 2007 года набирает популярность новый метод характеристики генетического полиморфизма боррелий - мультилокусный анализ нуклеотидных последовательностей (MLSA). Для анализа предлагались несколько комбинаций локусов, однако наиболее мощным оказался предложенный G. Margos с соавторами подход на основе изучения последовательностей 8 метаболических (housekeeping) генов clpA, clpX, nifS, pepX, pyrG, recG, rplB, и uvrA [Margos G., 2008]. В результате именно этот метод преимущественно используется для описания разнообразия *B. burgdorferi sensu lato* и характеристики их видовой и популяционной структуры.

Разнообразие *B. burgdorferi sensu lato* непрерывно растет и сейчас к этому комплексу относят уже 20 геновидов, 15 из которых признаны валидными видами (Табл. 1). [Margos G., 2011; Ivanova L.B., 2014]. Можно условно выделить два основных пути выявления новых боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Во-первых, новые виды *B. burgdorferi sensu lato* появляются за счет пересмотра таксономического положения атипичных штаммов ранее описанных видов на основе мультилокусного или полногеномного анализа их нуклеотидных последовательностей. Так, вид *B. garinii* ранее разделялся на Евразийский вариант 20047 и азиатский вариант NT29, причем считалось, что первый ассоциирован с птицами в качестве теплокровных хозяев, а второй - с мышевидными грызунами [Masuzawa T., 2004]. Однако на основе анализа множественных фрагментов генома (MLSA) ряд штаммов *B. garinii* с прототипным штаммом Pbi были выделены в новый вид *B. bavariensis* [Margos G., 2009], к которому и были позднее отнесены боррелии варианта NT29 [Mukhacheva T.A., 2013]. Аналогичным образом, атипичные штаммы *B. bissettii* были отнесены к новому виду *B. kurtenbachii* [Margos G., 2014]. На основе полногеномного секвенирования

ряда западно-европейских изолятов *B. burgdorferi sensu stricto* был сформирован вид *B. finlandensis* [Casjens S.R., 2011]. Для видов *B. burgdorferi sensu lato* обнаруженных этим способом характерно обитание на одной и той же территории и, зачастую, использование одних и тех же хозяев и переносчиков, но с разной интенсивностью. Второй источник новых видов *B. burgdorferi sensu lato* – исследование нетипичных хозяев в малоизученных географических регионах. Так были обнаружены боррелии, адаптированные к очень узкому спектру хозяев – *B. turdii*, *B. tanukii*, *B. lusitaniae*, *B. chiliensis* [Fukunaga 1996<sup>1,2</sup>; Ivanova, L.B., 2014].

Внутривидовое разнообразие

### **Циркуляция в природе и поддержание стабильных природных очагов *B. burgdorferi sensu lato***

Для разных видов *B. burgdorferi sensu lato* достаточно хорошо описана их адаптация к специфичным позвоночным хозяевам. Паразитарная система КБ составлена классической триадой возбудитель-переносчик-позвоночный хозяин [Васильева И.С., 1997; Piesman J., 1989]. Переносчиков, в зависимости от их роли в передаче инфекции и поддержании очагов, можно отнести к одной из пяти групп [Балашов Ю.С. 1998; Piesman J., 1992].

Основными переносчиками *B. burgdorferi s.l.* (Группа 1) в Евразии являются иксодовые клещи комплекса *I. persulcatus*. На территории России из переносчиков основное значение имеют клещи *I. persulcatus* в восточных районах и на отдельных территориях лесной зоны европейской части страны и *I. ricinus* в западных регионах. [Балашов Ю.С. 1998; Коренберг Э.И., 1985; Piesman J., 1989]. От Прибалтики до Тихого океана, включая Японию и Манчжурию, доминирующий вид иксодовых клещей - *I. persulcatus*. В Европейской части Евразийского континента распространен *I. ricinus*. Его ареал занимает пространство от Ирландии на Западе до р. Волга на Востоке. Наибольшей численности этот вид достигает в зоне широколиственных лесов, смешанных и хвойных лесах Скандинавии и Карелии и в

среднеюжнотаежных лесах России [Филипова Н.А., 1977]. Эти клещи отличаются от остальных иксодид широтой распространения, высокой численностью, способностью активно нападать на человека, полигостальностью. Эта группа играет ведущую роль в эпидемическом процессе КБ [Piesman J., 198].

Группа 2 - восприимчивые клещи рода *Ixodes*, не относящиеся к комплексу *I. persulcatus*. Это *I. dentatus*, *I. neotomae*, *I. uriae*, *I. ovatus*, *I. trianguliceps*, *I. columnae*, *I. turdus*. Они часто инфицированы в природе, могут передавать спирохет и в ходе жизненного цикла и позвоночным хозяевам при питании. Однако ареалы их обитания эндемичны а для существования требуется специфичный прокормитель. На человека нападают реже. Играют значительную роль в поддержании эпизоотических процессов [Акимов И.А., 1995; Горелова Н.Б., 1996; Nakaо M., 1992].

Группа 3 - маловосприимчивые клещи рода *Ixodes*, не относящиеся к комплексу *I. persulcatus* - *I. cookei*, *I. holocyclus*, *I. angustus* и др. Редко заражены в природе. Значения как переносчики боррелий не имеют [Ryder J.W., 1992].

Группа 4 - клещи семейства *Ixodidae* не относящиеся к роду *Ixodes*: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemophysalis*. Зараженность этих клещей боррелиями в природе низкая, передача боррелий хозяину при питании происходит редко. Однако клещи этой группы являются основными переносчиками КБ в отсутствие клещей рода *Ixodes*. Например, *H. bispinosa* в юго-западном Китае [Zhang, 1996] или *Dermacentor variabilis* на восточном побережье США [Sonenshine D.E., 1995].

Группа 5 - кровососущие насекомые: различные виды блох, комаров, слепней из которых изредка выделяют боррелий. Не могут долго сохранять и передавать спирохет, плохо воспринимают их в экспериментальных условиях [Magnarelli LA, 1988].

Спонтанная инфицированность клещей боррелиями в природных очагах варьирует от 1-4% до 80-100%. Наибольшие показатели зараженности

отмечены для *I. scapularis* - от 20 до 80-100% [Lane R.S., 1991; Amerasinghe F.P., 1992], наименьшие - для *I. pacificus* – 1-13% [Lane R.S., 1991; Clover J.R., 1995]. Клеши *I. ovatus* могут быть инфицированы на 18-24% [Nakao M., 1999]. Зараженность *I. persulcatus* колеблется от 8 до 66% (Коренберг Э.И., 1988; Алексеев А.Н., 1993). Инфицированность *I. ricinus* ниже - от 6 до 33%, редко до 55% [Junttila J., 1994]. На зараженность клещей влияют многие факторы, прежде всего ландшафтно-географические условия обитания популяции. Так, в Челябинской области за 1991-1998гг. зараженность клещей *I. persulcatus* боррелиями в горно-лесной зоне составляла в среднем 11,8%, в лесостепной - 5,3% [Тарасов В.Н., 2000]); в Тюменской области в средней и южной тайге боррелии были обнаружены соответственно в 27,5% и 32,8% исследованных клещей, в подтайге - в 44,6%, а в лесостепи только в 22,6% [Колчанова Л.П., 1997]. Отмечена антигенная гетерогенность боррелий в разных популяциях клещей [Hu C.M., 1994].

Возможно одновременное заражение одного клеща разными видами боррелий. Так, в окрестностях Санкт-Петербурга в 1995-1996 гг. было собрано и исследовано 487 клещей *I. persulcatus*. По данным темнопольной микроскопии 144 клеща (29,6%) были инфицированы боррелиями. Шестьдесят из этих инфицированных клещей были проанализированы в ПЦР. В 1995г. 11 из 21 исследованного клеща (52,4%) были одновременно инфицированы как *B. afzelii* так и *B. garinii*. В 1996г. 81,2% исследованных клещей было заражено *B. garinii*, тогда как микстинфицирование отмечено в 12,5% случаев [Alekseev A.N., 1998].

Есть данные, свидетельствующие о том, что определенные геновиды боррелий приурочены к определенным видам переносчиков. Среди всех изолятов боррелий из *I. persulcatus* явно преобладают два вида боррелий - *B. garinii* и *B. afzelii*, а *B. burgdorferi s. stricto* из этих клещей изолируют очень редко. В азиатской части нозоареала КБ изолятов *B. burgdorferi s. stricto* из *I. persulcatus* практически не встречается [Liang J.G., 1996; Takada N., 1998]. *I. ovatus* считается специфическим переносчиком *B. japonica*. Данные Nakao и



др. [Nakao M., 1994] свидетельствуют, что в экспериментальных условиях клещи *I. ovatus* не восприимчивы к спирохетам, вызывающим болезнь Лайма у людей. *I. dentatus*, по видимому, является единственным переносчиком *B. andersonii* [Oliver J. H., 1996].

Прокормителями клещей и естественными хозяевами боррелий в природных очагах КБ выступают более 200 видов диких позвоночных, из них около 130 - мелкие млекопитающие и 100 видов птиц [Балашов Ю.С., 1996; Fish D., 1989; Anderson, J.F., 1991]. Боррелийная инфекция выявлена у многих домашних животных - собак [Novius K.E., 1999], лошадей [Doby J.M., 1988], овец и коз [Bergmann J., 1992]. *B. japonica* была выделена от мышевидных грызунов, птиц [Masuzawa T., 1997; Masuzawa T., 1995]. *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* и *B. afzelii* также были изолированы от многих видов позвоночных [Anderson J.F., 1991]. Однако в некоторых случаях наблюдается явная взаимосвязь между геновидом выделенного возбудителя и источником выделения. Например, все известные к настоящему времени изоляты *B. valaisiana* в Европе получены от птиц и ни одного - от млекопитающих [Humair P.F., 1988; Kurtenbach K., 1998]. Одним из наиболее изученных механизмов адаптации является резистентность спирохет к системе активации комплемента хозяина. Комплемент млекопитающих разных видов обладает специфичным действием на боррелии, при этом выделяется 3 группы позвоночных хозяев. К группе случайных хозяев относят крупный рогатый скот (КРС), бизонов и диких лесных оленей [Rosef O. и др., 2009]. Установлено, что благородный олень, несмотря на существенное значение в качестве прокормителя иксодовых клещей, не развивает инфекцию *B. burgdorferi s.l.* [Ebani V.V. и др., 2016]. При контакте с сыворотками крови КРС и Европейского бизона, 97-99% клеток боррелий лизировались в течение 6 часов вне зависимости от вида спирохет. Сыворотки крови лани, косули и благородного оленя также обладали высокой боррелиецидной активностью – погибало 72-99% клеток - однако лизиса бактерий не наблюдалось [Bhide M.R. и др., 2005].

Чувствительность к комплементу сыворотки крови человека – 93% комплемент-чувствительных изолятов принадлежали видам *B. burgdorferi sensu stricto* и *B. garinii*, в то время как 83% комплемент-резистентных изолятов – к виду *B. afzelii*. [Kraiczy P. и др., 2000]. Сыворотки крови мышевидных грызунов и птиц обладали ярко выраженным специфичным действием на разные виды *B. burgdorferi sensu lato*. Так, на территории Евразии обитают *B. garinii* и *B. bavariensis* их ареалы пересекаются, основными переносчиками этих бактерий являются клещи *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Однако в качестве позвоночных хозяев *B. bavariensis* и *B. afzelii* адаптированы к организму мелких грызунов [Hanincová K, 2003], тогда как *B. garinii* и *B. valaisiana* в качестве специфичных резервуарных хозяев, по всей вероятности, используют птиц [Margos G., 2009; Hanincová K., 2003]. Некоторые авторы считают, что именно организм позвоночных хозяев, а не клещей является ключевым эволюционным фактором в формировании разнообразия *B. burgdorferi sensu lato* [Kurtenbach K., 2002].

[Coipan E.C., 2013]

Установлена высокоэффективная (до 92%) трансфазовая передача боррелий у большинства видов клещей-переносчиков, [Stanek G., 1986; Васильева И.С., 1997]

Эффективность трансовариальной передачи *B. burgdorferi sensu lato* очень низкая – порядка 0,5 % в клещах *I. persulcatus* [Nefedova V.V. и др., 2004] и эпизоотологическое значение ее невелико.

Процесс насыщения кровью самок иксодовых клещей может продолжаться 6-8 дней. В начале питания клещ может передавать боррелии только, если они уже находятся в слюнных железах, т.е. при генерализованной инфекции клеща (примерно 30-35% всех голодных клещей в природе). Если боррелии находятся только в кишечнике клеща, то их передача осуществляется через 1-2 дня после присасывания [Москвитина Г.Г., 1995].

*B. afzelii* и *B. burgdorferi sensu stricto* из голодных *I. ricinus* не способны инфицировать мышей при подкожном введении, однако если клещей предварительно прокармливать в течение 24 часов эти боррелии становятся инфекционными для млекопитающих [Crippa M., 2002]. Диссеминация боррелий из места укуса клеща занимает порядка 2 дней, до этого системная инфекция не развивается [Shih C-M., 1992; Richter D., 2002].

Несистемная трансмиссия имеет большое значение для существования природных популяций *B. burgdorferi sensu lato* [Gern L., Rats O., 1996; Ogden N.H., 1997]. Процесс несистемной трансмиссии может быть достаточным для устойчивого существования природного очага *B. burgdorferi sensu lato* даже при отсутствии позвоночных хозяев, поддерживающих системную боррелиозную инфекцию [Ogden N.H., 1997]. Несистемная трансмиссия *B. burgdorferi sensu lato* происходит значительно медленнее, чем трансмиссия ВКЭ и в течение первых 48 часов боррелии репродуцируются в прилегающем к месту укуса участке кожи диаметром порядка 6 мм. [Shih C.M., 1992]. Отмечено, что трансмиссия *B. afzelii* происходит быстрее, чем *B. burgdorferi sensu stricto* [Crippa M., 2002]. В случае с боррелиями, при несистемной трансмиссии большее значение имеет пространственное расположение прикрепившихся личинок, нежели одновременность питания [Randolph S.E., 1996].

## **2.2. Микроорганизмы порядка *Rickettsiales*.**

В порядок *Rickettsiales* входит очень большое количество близкородственных грамотрицательных бактерий, вызывающих заболевания человека. В настоящем обзоре будут рассмотрены только те из них, которые экологически связаны с клещами *I. persulcatus*, *D. silvarum* и *D. nuttalli* и ассоциированы с природными очагами клещевых инфекций в Сибири, а именно *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, а также некоторые виды риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок. [Усков А.Н. и др., 2010]. Хотя в настоящее время наиболее значимыми клещевыми инфекциями в

России считаются КЭ и КБ, история изучения этой группы зоонозов началась именно с представителей альфа-1-протеобактерий. Первым описанным микроорганизмом, передающимся человеку при укусе клеща, стал открытый в 1910г. Н.Т. Ricketts возбудитель пятнистой лихорадки скалистых гор, впоследствии названный *Rickettsia rickettsii* [Здродовский П.Ф., 1948]. После этого началось интенсивное изучение этой группы микроорганизмов. К настоящему времени описано 28 валидных видов риккетсий, 8 видов анаплазм и 10 видов риккетсий [Рудаков Н.В. и др., 2012; Euzeby J.P., 2008, Garrity G.M. и др., 2004 и др.]. Большинство риккетсий вызывают заболевание человека – к настоящему времени определена этиология и изучены клиническое течение и эпидемиология, по меньшей мере, 21 заболевания, вызываемого различными видами и подвидами риккетсий [Тарасевич И.В., 2005]. Из анаплазм и эрлихий только *A. phagocytophilum* [Chen S-M. и др., 1994] , *E. chaffensis*, *E. ewingii* [Anderson B.E. и др., 1991, 1992] и, предположительно, *E. muris* [Нефедова и др., 2008] вызывают заболевания у людей, патогенность остальных микроорганизмов до сих пор не доказана.

Характерно, что интенсивность исследований разнообразия риккетсий, анаплазм и эрлихий существенно увеличилась в последние два десятилетия, например, из 28 видов риккетсий, 13 описаны между 1990 и 2008 гг. Так, например, на основе анализа фрагментов генома, были описаны новые микроорганизмы, инфицирующие таежных клещей - *Candidatus R. tarasevichiae* и риккетсие-подобный микроорганизм “Montezuma” [Шпынов С.Н. и др., 2005; Медянников О.Ю. и др., 2004].

Во многом такой прорыв стал возможен благодаря развитию и внедрению в широкую практику геномных технологий исследования. Дело в том, что многие бактерии порядка *Rickettsiales* являются настолько близкородственными, что обычные микробиологические и серологические методы исследований не позволяют дифференцировать эти микроорганизмы даже на уровне рода. Это приводит к недооценке разнообразия этих

микроорганизмов, и, следовательно, к ошибкам в диагностике заболеваний и в интерпретации научных результатов [Parola, P., Raoult D., 2001; Brouqui, P., Dumler J. S., 2000]. В первую очередь это относится к представителям сем. *Anaplasmataceae* – анаплазмам и эрлихиям, современная полифазная систематика которых основана на тщательном филогенетическом анализе [Vandamme P. и др., 1996, Inokuma H. и др., 2001].

В Прибайкалье изучение распространенности и разнообразия альфапротеобактерий начато в середине XX века исследованиями Г.И. Феоктистова, который изучал иммунологические и патогенные свойства риккетсий, выделенных от больных людей и клещей *D. nuttalli* и *D. silvarum* [Феоктистов Г.И., 1961]. В дальнейшем сотрудниками Иркутского Института эпидемиологии и микробиологии были проведены исследования по идентификации возбудителя клещевого риккетсиоза в Иркутской области и изучение его биологических свойств. В опытах по перекрестному иммунитету с эталонным штаммом *R. sibirica* «Нецветаев» и в реакции связывания комплемента с антигенами *R. sibirica*, *R. conori* и *R. prowazeki* было исследовано 24 штамма микроорганизмов, выделенных от больных людей и клещей *D. nuttalli*. Оказалось, что все исследованные штаммы имеют наибольшее сродство с *R. sibirica*, кроме того, были описаны морфология возбудителя, патогенные свойства риккетсий на моделях лабораторных животных и отмечена низкая (~25 %) выделяемость возбудителя от больных людей [Мирончук Ю.В., 1965].

Возбудители клещевых инфекций, принадлежащие порядку Rickettsiales, это маленькие по размеру (0,3 – 1,5 мкм), облигатно внутриклеточные Грам-отрицательные бактерии. В зависимости от таксономической принадлежности, бактерии реплицируются в мембранных компартментах внутри гранулоцитов (*A. phagocytophilum*), моноклеарных фагоцитов (*E. chaffeensis*, *E. muris*) или клеток сосудистого эндотелия (*Rickettsia sp.*) [Rikihisa Y., 1991; Rikihisa Y., 1999]. Процесс репликации этих микроорганизмов проходит в вакуолях клетки хозяина, где бактерии

формируют характерные микроколонии, получившие название морулы [Rikihisa Y., 1999; Paddock C.D., 1997.; Popov V.L., 1995]. Все микроорганизмы пор. *Rickettsiales* могут быть изолированы и исследованы только в культуре клеток либо в организме лабораторных животных. Дикие парнокопытные, например благородный олень, являются компетентными резервуарными хозяевами для *A. phagocytophilum* [Ebani V.V. и др., 2016].

Для микроорганизмов сем. *Anaplasmataceae* (*A. phagocytophilum*, *E. chafeensis*, *E. muris*) не отмечена трансвариальная трансмиссия [Ogden N.H., 1998], таким образом, организм млекопитающих является основным резервуаром и средой обитания этих бактерий. Бактерии сем. *Rickettsiaceae* (*R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. heilogjianensis*) эффективно передаются как трансвариально (эффективность трансмиссии 43-100%) так и трансфазово (80-100%) [Самойленко И.Е., 2013], что означает существенную роль клещей не только как переносчиков инфекции, но и как резервуарных хозяев этих инфекций. В циркуляции микроорганизмов порядка *Rickettsiales* неvirемическая трансмиссия, судя по всему, не играет существенной роли [Kocan K.M., 2003].

### **Заключение:**

При анализе биологических и экологических характеристик патогенных для человека микроорганизмов, инфицирующих иксодовых клещей – вируса клещевого энцефалита, *B. burgdorferi sensu lato*, и других выявляются две общие черты. Во-первых, все они, независимо от формы жизни или видовой принадлежности, на внутривидовом уровне существуют в форме относительно независимых популяций бесконечно циркулирующих между беспозвоночными и позвоночными хозяевами при помощи сходных процессов горизонтальной и вертикальной трансмиссии [Алексеев А.Н., 1993. Gritsun T.S., 2003; Tilly K., 2008; Thomas R.J., 2009; Dykhuizen D.E., 1993]. Во-вторых, для возбудителей каждого из этих заболеваний характерно существенное межвидовое и внутривидовое генетическое разнообразие,

которое по мере развития наших знаний о клещевых инфекциях только увеличивается. Столь общие черты, наблюдаемые среди столь разных организмов, наводят на ряд вопросов, ключевых для понимания природы трансмиссивных инфекций. Какими природными факторами обусловлено формирование разнообразия «клещевых» микроорганизмов? Какую роль это разнообразие играет в устойчивой циркуляции этих возбудителей в природе? Каким образом этот фактор влияет на степень опасности микроорганизмов для человека? Есть ли какие-то общие уязвимые элементы в бесконечной череде циклов трансмиссии «клещевых» патогенов? Ответы на эти вопросы, возможно, раскроют новые свойства триады трансмиссивных инфекций и позволят разработать способы устойчивого снижения численности переносчиков либо их зараженности патогенными микроорганизмами.

Более того, общность переносчиков и хозяев для клещевого боррелиоза, клещевого энцефалита, риккетсиоза, эрлихиоза и бабезиоза обуславливает возникновение сочетанных очагов инфекции. Так, в Нью Джерси (США) из 100 исследованных клещей *I. scapularis* 6 были одновременно инфицированы *B. burgdorferi* и возбудителем гранулоцитарного эрлихиоза, 2 - *B. burgdorferi* и *Babesia microti* - возбудителем бабезиоза человека и 2 - возбудителем гранулоцитарного эрлихиоза *E. chaffeensis* [Shobha V., 1998]. В России природные очаги КБ как правило сопряжены с очагами клещевого энцефалита (КЭ). Доля клещей, одновременно инфицированных боррелиями и вирусом КЭ в таких очагах достигает 2,4%-10% [Сунцова О.В., 1996, Коренберг Э.И., 1996]. До 40 % клещей, зараженных боррелиями, может быть инфицировано одновременно разными видами боррелий [Gorelova N.B., 1996], что также является одним из факторов, влияющих как на циркуляцию патогенов в естественных экосистемах, так и на эпидемические проявления клещевых инфекций.

## ГЛАВА 3. Материалы и методы

### 3.1. Район исследований

Основные материалы для изучения разнообразия клещевых микроорганизмов были собраны в Иркутской области и Республике Монголия (рис. 3-1). Для проведения анализа филогеографических взаимосвязей микроорганизмов выделено 7 регионов (Табл. 3-1) согласно географическим границам основных растительных комплексов северной и центральной Евразии [Физико-географический атлас..., 1964] а также естественным физическим препятствиям (крупные водостоки, горные массивы).



**Рисунк 3-1. Район исследования.** Район работ выделен белым прямоугольником, цветными линиями обозначены ареалы обитания фоновых видов иксодовых клещей в соответствии с [Колонин Г.В., 1981; Колонин Г.В., 1984]. Легенда приведена в верхнем правом углу.



**Таблица 3-1.** 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	Количество проанализированн ых 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 (C)	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 (Kyrgh)	Кыргызстан		2	Кыргызстан

### 3.2. Материалы

Для выполнения диссертации были исследованы следующие материалы: 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*, перевиваемые культуры клеток млекопитающих.

#### Клещи

Всего в процессе работы 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*.

Клещей *I. persulcatus*, *D. silvarum* и *D. nuttalli* отлавливали по стандартной методике на флаг и доставляли в лабораторию в живом виде. Идентификацию клеща производили по морфологическим признакам в соответствии с определителями фауны иксодовых клещей СССР [Сердюкова Г.В., 1956; Филиппова Н.А., 1977]. Перед работой клещей промывали дважды в 70% этаноле, один раз – в стерильной дистиллированной воде и затем обсушивали на стерильной фильтровальной бумаге. После этого каждого клеща помещали в 0,5 мл пробирку эппендорф и хранили до исследования при -80°C.

Клещи *I. ricinus*, использованные в экспериментальных исследованиях, были выращены в лабораторной колонии Institute of Zoology, Slovak Academy of Science (Братислава, Словакия) [Labuda М. и др., 1996].

#### Образцы от больных людей и людей, обратившихся с укусами клещей

В работе использовано 45 образцов сывороток крови от больных с подозрением на КР или с наличием лихорадки неустановленной этиологии. Сбор исходных данных от пациентов, обезличивание персональных данных и первичная обработка информации проведены с помощью

зарегистрированной электронной базы данных «Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, результаты лабораторных исследований их клещей и сывороток крови, и меры профилактики» [Данчинова Г.А. и др., 2009].

Пациент TBEV-MN-2008, взрослый мужчина, был укушен клещом (предположительно *Ixodes persulcatus*) 10 июня 2008 г. в Булганском аймаке Монголии. Через 11 дней после укуса пациент был госпитализирован с диагнозом «менингоэнцефалит» и скончался на 11 день болезни. У умершего пациента были взяты образцы тканей продолговатого мозга (TBEV-MN-2008-105), мозжечка (TBEV-MN-2008-106), коры головного мозга (TBEV-MN-2008-107) и смеси тканей мягкой оболочки головного мозга, расширенной части шеи и спинного мозга и нижней части коры головного мозга (TBEV-MN-2008-108). Образцы тканей умершего были взяты в соответствии с 40-м разделом «Закона о здоровье» Монголии для подтверждения диагноза болезни и причины гибели больного. Забор выполнялся с соблюдением норм биомедицинской этики. Материалы предоставлены Национальным Центром по изучению природно-очаговых болезней МЗ Монголии в рамках программы совместных научных исследований.

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 ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН.

### **Изоляты и штаммы ВКЭ**

В работе было использовано 15 штаммов ВКЭ полученных из естественных источников, 13 искусственно созданных нами штаммов и 4 образца РНК, 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 находятся в коллекции вирусов клещевого энцефалита ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и были предоставлены для исследования сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Типовые штаммы Нург и Васильченко были взяты из коллекции Centre for ecology and hydrology “Oxford” NERC (Великобритания).

Определение нуклеотидных последовательностей всех штаммов, изолятов и образцов РНК ВКЭ кроме типовых штаммов Нург и Васильченко было проведено автором. Детальное описание материалов приведено в табл. 3-2 и 4-1.

### **Изоляты *B. burgdorferi sensu lato***

В работе использовано 6 изолятов *B. burgdorferi sensu lato* от клещей *I. persulcatus* из Монголии и 15 образцов ДНК боррелий из Монголии и Иркутской области. Изоляция боррелий проведена О.В. Строниным в ФГУ «НПО Вирион» (Томск), секвенирование фрагментов генома изолятов боррелий выполнено Н.В. Фоменко (Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск). Образцы ДНК боррелий из Иркутской области получены и охарактеризованы автором лично. Детальное описание материалов дано в табл. 3-2 и 4-4.

### **Изоляты микроорганизмов пор. *Rickettsiales***

Микроорганизмы пор. *Rickettsiales* были исследованы только в виде образцов ДНК, полученных из суммарной ДНК клещей. Всего исследовано 40 индивидуальных микроорганизмов, инфицирующих клещей *I. persulcatus*, *D. nuttalli* и *D. silvarum*. Детальное описание материалов дано в табл. 3-2.

## **Культуры клеток млекопитающих**

Перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ приобретена в «Коллекции клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии» (ФГБУ "НИИ гриппа" МЗ России, Санкт-Петербург). Клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (БиоЛот, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин+стрептомицин) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (ThermoScientific, UK). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5%CO<sub>2</sub> и пересевали согласно паспорту 1 – 2 раза в неделю.

### **3.3. Методы**

Для решения поставленных задач был использован ряд **зоолого-паразитологических** (учеты численности, отлов, определение видовой принадлежности иксодовых клещей и мелких млекопитающих), **молекулярно-генетических** (обратная транскрипция, ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов генома микроорганизмов в плазмидных бактериальных векторах, технология инфекционного клонирования флавивирусов, модификация ВКЭ с помощью направленного мутагенеза), **вирусологических и микробиологических** (прямая микроскопия, РНИФ, РГА, РТГА, реакция нейтрализации, оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в животных моделях, оценка трансмиссии при экспериментальной инфекции клещей *I. ricinus*) а также **статистических** методов. Детальное описание наиболее важных из них приводится ниже.

**Таблица 3-2.** Характеристика использованных в работе образцов вируса клещевого энцефалита, *B. burgdorferi sensu lato*, *Rickettsia sp*, и других микроорганизмов

№пп	Наименование изолята	Источник изоляции	Год	Место изоляции	ссылка
Вирус клещевого энцефалита; штаммы, изолированные из естественных источников					
1	Нурр	<i>Homo sapiens</i> , менингеальная форма КЭ, двухволновое течение	1953	Чехия, Брно	Wallner G. и др., 1995
2	Васильченко	<i>Homo sapiens</i> , лихорадочная форма КЭ	1961	Новосибирская область	Gritsun T. S. и др., 1993
3	1G-98	<i>Homo sapiens</i> , лихорадочная форма КЭ	1998	Иркутская область	Верхозина М.М. и др., 2007
4	2517-05	<i>Homo sapiens</i> , хронический КЭ	2005	Иркутская область	Верхозина М.М. и др., 2007
5	3869-03	<i>Homo sapiens</i> , инаппарантный КЭ	2003	Иркутская область	Верхозина М.М. и др., 2007
6	413-04	<i>Homo sapiens</i> , менингеальная форма КЭ, двухволновое течение	2004	Иркутская область	Верхозина М.М. и др., 2007
7	IRK Ip5\70- 2010	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
8	MNG 92M	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
9	MNG 940M	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
10	MNG D13-15	<i>I. persulcatus</i>	2013	Монголия	Эта работа
11	MNG D13-37	<i>I. persulcatus</i>	2013	Монголия	Эта работа
12	Яр 114	<i>I. persulcatus</i>	2001	Ярославская область	Эта работа
13	Яр 46-2	<i>Homo sapiens</i> , очаговая форма КЭ	2001	Ярославская область	Эта работа
14	Яр 48	<i>I. persulcatus</i>	2000	Ярославская область	Эта работа
15	Яр 71	<i>I. persulcatus</i>	1999	Ярославская область	Эта работа

**Таблица 3-2. Характеристика образцов...(продолжение)**

№пп	Наименование изолята	Источник изоляции	Год	Место изоляции	ссылка
Вирус клещевого энцефалита; искусственно созданные штаммы					
1	pGGVsH (Vs IC)	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон штамма «Васильченко»	Эта работа
2	Hupr IC	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон штамма «Нург»	Эта работа
3	IC-D67G	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
4	IC-E122G	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
5	IC-D277A	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
6	IC-T175N	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
7	Hupr IC short	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
8	Hupr [Vs E]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
9	Hupr [Vs prM-E]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
10	Hupr [Vs str]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
11	Vs [Hupr E]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
12	Vs [Hupr prM-E]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
13	Vs [Hupr str]	Культура клеток СПЭВ	-	Инфекционный клон	Эта работа
Вирус клещевого энцефалита; образцы РНК					
1	IRK 38-2009	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа
2	MNG Ip283\9- 2005	<i>I. persulcatus</i> ,	2005	Монголия	Эта работа
3	MNG Ip290\2- 2005	<i>I. persulcatus</i>	2005	Монголия	Эта работа
4	TBEV-MN- 2008	<i>Homo sapiens</i> , менингеальная форма КЭ	2008	Монголия	Эта работа

**Таблица 3-2.** Характеристика образцов...(продолжение)

№пп	Наименование изолята	Источник изоляции	Год	Место изоляции	ссылка
<i>B. burgdorferi sensu lato</i> ; изоляты бактерий					
1	Mng 7-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
2	Mng 16-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
3	Mng 36-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
4	Mng 43-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
5	Mng 47-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
6	Mng 67-02	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	Эта работа
<i>B. burgdorferi sensu lato</i> ; образцы ДНК					
1	1524	<i>I. persulcatus</i>	2000	Иркутская область	Эта работа
2	17B	<i>I. persulcatus</i>	2000	Иркутская область	Эта работа
3	2-9NO	<i>I. persulcatus</i>	2001	Иркутская область	Эта работа
4	3342	<i>I. persulcatus</i>	2001	Иркутская область	Эта работа
5	3746	<i>I. persulcatus</i>	2000	Иркутская область	Эта работа
6	7S	<i>I. persulcatus</i>	2001	Иркутская область	Эта работа
7	IRK 5-57-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
8	IRK 5-81-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
9	IRK 5-82-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
10	IRK 9-12-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
11	IRK 9-15-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
12	IRK 9-16-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
13	IRK 9-5-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	Эта работа
14	MNG Ip75-08	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
15	MNG Ip90-08	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа



Таблица 3-2. Характеристика образцов...(продолжение)

№пп	Наименование изолята	Источник изоляции	Год	Место изоляции	ссылка
Микроорганизмы порядка <i>Rickettsiales</i> ; образцы ДНК					
1	1943 Ip	<i>I. persulcatus</i>	2006	Иркутская область	Эта работа
2	2006 Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
3	22 Ds	<i>D. silvarum</i>	2004	Иркутская область	Эта работа
4	222 Dn	<i>D. nuttalli</i>	2006	Иркутская область	Эта работа
5	231 Dn	<i>D. nuttalli</i>	2006	Иркутская область	Эта работа
6	232 Ds	<i>D. silvarum</i>	2007	Иркутская область	Эта работа
7	2325 Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
8	25 Ds	<i>D. silvarum</i>	2004	Иркутская область	Эта работа
9	471	<i>I. persulcatus</i>	2007	Иркутская область	Эта работа
10	473	<i>I. persulcatus</i>	2007	Иркутская область	Эта работа
11	77-Chap Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
12	MNG-114	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
13	MNG-133	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
14	MNG-137	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
15	MNG-19	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
16	MNG-282\10-2008	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
17	MNG-283\5-2008	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
18	MNG-286\2-2008	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
19	MNG-291\7-2008	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
20	MNG-36	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
21	MNG-48	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа
22	MNG-67	<i>D. nuttalli</i>	2008	Монголия	Эта работа

**Таблица 3-2.** Характеристика образцов...(окончание)

№пп	Наименование изолята	Источник изоляции	Год	Место изоляции	ссылка
23	2017 Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
24	2311 Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
25	2324 Ds	<i>D. silvarum</i>	2005	Иркутская область	Эта работа
26	2853 serum	<i>H. sapiens</i> , сыворотка крови больного	2006	Иркутская область	Эта работа
27	3088 serum	<i>H. sapiens</i> , сыворотка крови больного	2006	Иркутская область	Эта работа
28	477	<i>I. persulcatus</i>	2007	Иркутская область	Эта работа
29	479	<i>I. persulcatus</i>	2007	Иркутская область	Эта работа
30	Ip142	<i>I. persulcatus</i>	2008	Иркутская область	Эта работа
31	Ip276/2	<i>I. persulcatus</i>	2005	Монголия	Эта работа
32	Ip281/2	<i>I. persulcatus</i>	2005	Монголия	Эта работа
33	Ip285/11	<i>I. persulcatus</i>	2008	Монголия	Эта работа
34	Ip368	<i>I. persulcatus</i>	2008	Иркутская область	Эта работа
35	Ip457	<i>I. persulcatus</i>	2008	Иркутская область	Эта работа
Некультивируемые бактерии pp. <i>Burkholderia</i> sp. и <i>Pseudomonas</i> sp.; образцы ДНК					
1	IRK-101	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа
2	IRK-111	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа
3	IRK-70-2009	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа
4	IRK-76-2F	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа
5	IRK-77-2F	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	Эта работа

## **Изоляция и культивирование ВКЭ**

Для изоляции ВКЭ клещей обрабатывали 70% этанолом и промывали в стерильной дистиллированной воде. После этого каждого клеща индивидуально гомогенизировали в 0,5 мл среды RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, но без ЭТС и заражали монослой клеток СПЭВ. После адгезии в течение 1 ч. при комнатной температуре инокулят удаляли и наслаивали на клетки среду RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков и 2% ЭТС. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5%CO<sub>2</sub> в течение 7 суток. Дважды в день проверяли состояние монослоя. На следующий день после обнаружения цитопатического эффекта культуральную среду собирали и очищали от дебриса с помощью центрифугирования при 2000 об\мин. в течение 10 мин. Очищенный супернатант разделяли на аликвоты по 0,5 мл и хранили при -80°C до исследования. Для исследования брали изоляты с короткой историей, не превышающей 4-6 пассажей.

## **Изоляция и культивирование *B. burgdorferi sensu lato***

Перед посевом клещей обрабатывали 70% этанолом и промывали в стерильной дистиллированной воде.

Бактериологический посев проводили согласно Barbour A. G. [Barbour A.G., 1984]. Комплекс внутренних органов клещей помещали в полную среду BSK-H, содержащую смесь антибиотиков: 0,02 г/л фосфомицина, 0,05 г/л рифампицина, 2,5 мг/л амфотерицина В (Sigma-Aldrich, США). Посевы инкубировали при 33-35°C в микроаэрофильных условиях до 60 сут. Еженедельно проводили контроль роста боррелий с помощью прямой световой микроскопии.

## Создание инфекционных клонов типовых штаммов ВКЭ

Выделение РНК и обратную транскрипцию типовых штаммов Нург и Васильченко проводили как описано ранее [Gritsun T.S., Gould E.A., 1998]. Обратную транскрипцию проводили с помощью ревертазы Superscript II (Invitrogen) и праймера TBE-3'14 (3'- agcgggtgttttcc-5') в течение 3 часов при 42°C. Общая схема инфекционного клонирования соответствовала ранее опубликованной [Gritsun T.S., Gould E.A., 1998].

Геном штамма Нург амплифицировали в высокоточной длиноразмерной ПЦР в виде трех перекрывающихся ампликонов, которые использовали для генноинженерных манипуляций (введение молчащих рестриктных сайтов). В результате были созданы две финальные плазмиды, рATVНург1-3159 и рDGHург3154-10835, кодирующие 5' и 3' части генома Нург соответственно. С 5'-конца плазмиды рATHург1-3159 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.

Исходный штамм Нург обладал делецией гипервариабельного региона внутри 3'НТР, предположительно вследствие длительного пассирования в мышцах и культурах клеток млекопитающих [Mandl C.W. и др, 1998; Hayasaka D. и др., 2001]. Для того чтобы оценить возможное влияние структуры 3'НТР на биологические свойства и циркуляцию ВКЭ между клещами, был создан штамм Нург IC с удлинненным 3'НТР, соответствующим по структуре штаммам Е-ВКЭ дикого типа и штамму Vs IC. Удлинненный 3'НТР был получен с помощью ПЦР из штамма Е-ВКЭ IR121-122/M1 и введен в плазмиду Нург3154-10835. В результате была получена плазида рATHург3154-11103, которая при лигировании с плазмидой Нург1-3159 позволила получить *in vitro* штамм Нург с длинным 3'НТР.

Инфекционный клон типового штамма Васильченко описан ранее и представляет собой две плазмиды, pGGVs[660-1982]H и pGGVs[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 воссоздания полноразмерной ДНК-матрицы для SP6 полимеразы.

### **Введение точечных мутаций в геном Vs IC**

Для введения точечных мутаций в геном Vs IC нами была разработана методика мегапраймер-опосредованной химеризации вирусов сходная с ранее опубликованной разработкой замены доменов в вирусных геномах [Perez K. и др., 2006]. Мутации вводили в плазмиду pGGVs[660-1982]H (рис. 3-2). 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 pGGVs660–1982H в качестве матрицы. Условия проведения ПЦР: 15 циклов 95°C в течение 30 сек., 60°C – 30 сек. и 72°C – 5 мин. Каждый цикл ПЦР производил полуразомкнутые молекулы дцДНК, причем замкнутая цепь ДНК происходила от матричной ДНК pGGVs660–1982H 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 завершения ПЦР реакционную смесь

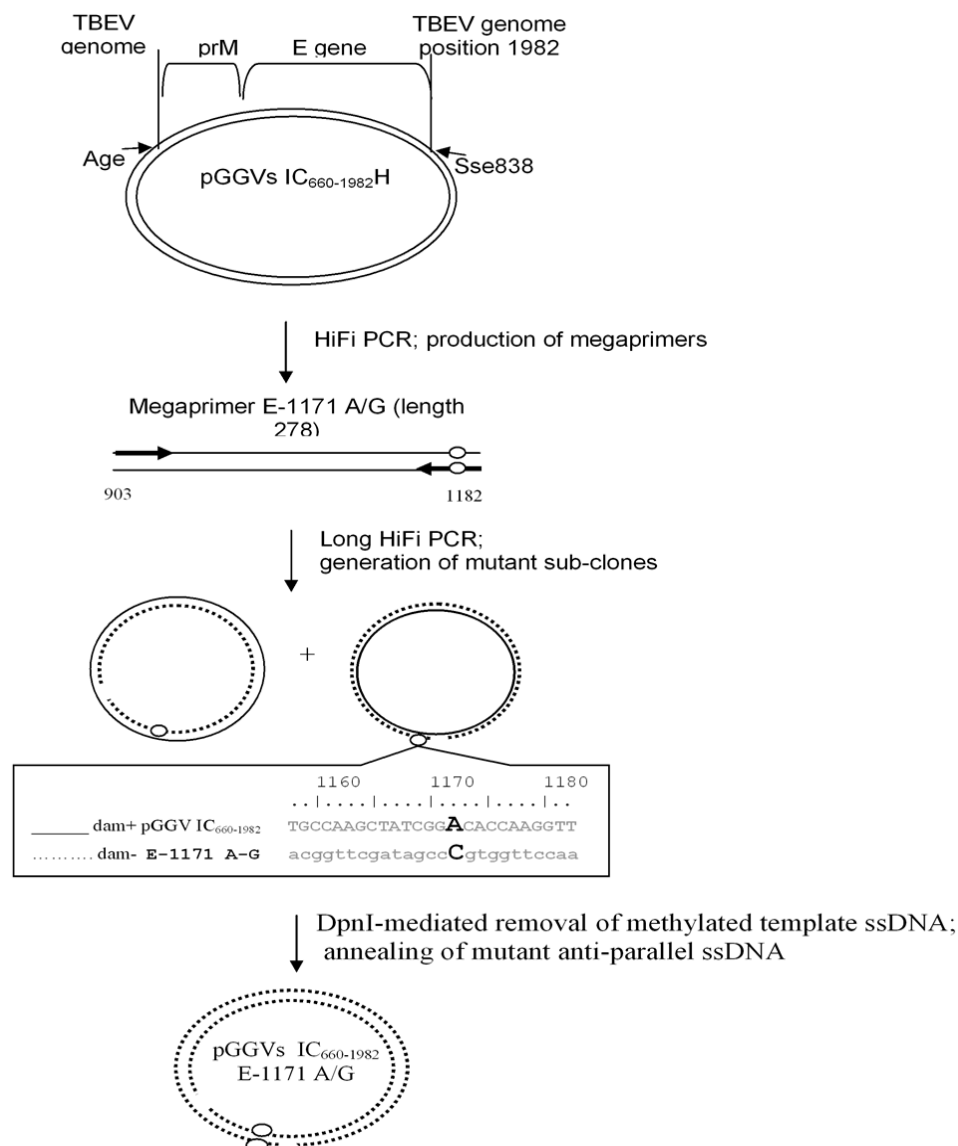
обрабатывали 40U рестриктазы DpnI (New England Biolabs) при 37°C в течение 1 часа. После такой обработки все матричные плазмиды оказывались лизированы, а в смеси оставались только мутантные ПЦР-копии (рис. 3-2). Далее ПЦР-продуктом трансформировали клетки *E. coli*, штамм AbleK (Stratagene), определяли полную нуклеотидную последовательность мутантных плазмид для нескольких колоний и из них выбирали для дальнейшей работы одну колонию, не содержащую никаких замен, кроме целевой мутации.

### **Создание рекомбинантных ВКЭ**

Инфекционные клоны 2 контрольных и 7 рекомбинантных и штаммов ВКЭ, содержащих взаимозаменяемые фрагменты геномов Vs IC и Hypr IC, были сконструированы с использованием ряда промежуточных плазмид. Детальное описание результатов этого процесса дано в главе 6 (рис. 6-2, 6-3). Основой для конструирования послужили плазмиды инфекционного клона Vs IC и Hypr IC (табл. 3-2, рис. 6-2) [Gritsun T. S., Gould E.A., 1998; Gritsun T.S. и др., 2001]. Все итоговые плазмиды, полученные в результате рекомбинаций были секвенированы по полной длине вставки фрагмента генома ВКЭ с помощью TaqBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и соответствующего оборудования.

### **Восстановление мутированных и рекомбинантных штаммов ВКЭ**

Для восстановления каждого рекомбинантного или мутантного штамма ВКЭ, две плазмиды обрабатывали соответствующими рестриктазами и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы (New England Biolabs) между собой. Одна из плазмид кодировала структурную часть генома ВКЭ (5'НТР-С-прМ-Е) и содержала либо химерные части Vs IC или Hypr IC, либо необходимую точечную мутацию. Другая плазмида была интактной и содержала неструктурные гены ВКЭ (NS1-NS5-3НТР).



**Рисунок 3-2. Мутагенез инфекционного клона ВКЭ Vs IC с использованием способа мегапраймер-опосредованной химеризации (на примере точечной мутации E-1171 A-G).**

Каждый лигированный полноразмерный инфекционный клон был затем линейаризован рестриктазой SmaI (New England Biolabs) и использован в качестве матрицы в *in-vitro* транскрипции с помощью SP6 РНК-полимеразы (New England Biolabs) согласно протоколу производителя [Gritsun T.S., Gould E.A., 1998]. 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 [Gould E.A., 1985] и с помощью ОТ-ПЦР. Геномы полученных рекомбинантных штаммов ВКЭ были расшифрованы а нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа KP716971 - KP716978.

### **Выделение ДНК\РНК**

Из культуральной жидкости после заражения клеток СПЭВ, из клеточных суспензий и из образцов тканей мозга РНК выделяли с помощью набора Total RNA Isolation System (Promega, USA) согласно инструкции производителя. Культуральную жидкость перед выделением РНК осветляли центрифугированием при 10-14 тыс. об./мин. Образец мозга (100-200мг) гомогенизировали в 1 мл стерильного раствора 0,7М NaCl, затем гомогенат очищали от фрагментов тканей центрифугированием при 12000об/мин в течение 5 мин. Для выделения использовали 200 мкл полученной суспензии. Осадок РНК растворяли в 50 мкл деионизированной стерильной воды и 10 мкл раствора РНК использовали для проведения обратной транскрипции (ОТ). Для устранения возможности контаминации, на этапах выделения РНК и ОТ-ПЦР не использовали положительные контроли. Также положительные контрольные образцы не использовали при ПЦР-амплификации фрагментов для секвенирования. Отрицательные контрольные реакции проводились на всех этапах анализа. Для того чтобы исключить ошибки ДНК-полимераз, каждый образец РНК исследовали в 2 независимых повторах ОТ-ПЦР и ПЦР-фрагменты от каждого повтора анализировали отдельно.

Иксодовых клещей перед выделением ДНК/РНК гомогенизировали в 250 мкл. 0,7М NaCl и очищали центрифугированием при 3000 об.мин в течение 5 мин. 100 мкл. полученной суспензии использовали для выделения ДНК и/или РНК. ДНК выделяли либо с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб» ("Амплисенс", Москва) согласно протоколу



производителя, либо по методу Дойла-Диксона с модификациями [1987]. Вкратце, 100мкл образца смешивали со 100мкл 2X СТАВ буфера (100 mM Tris HCl (pH=8.0); 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% СТАВ; 0,2% β меркаптоэтанол) и инкубировали при 65 °С в течение 20 мин. Затем проводили экстракцию белков 500 мкл. смеси фенол–хлороформ (1:1). К верхней (водной) фазе добавляли равный объем изопропанола, инкубировали в течение 20 мин. при –20 °С, центрифугировали в течение 15 мин. при 10000–12000 об./мин. (микроцентрифуга) и промывали осадок 1 мл 70% этанола.

Для выделения образцов РНК из клещей использовали наборы Рибо-Сорб и Рибо-Преп ("Амплисенс", Москва) согласно протоколу производителя. Очищенную ДНК/РНК растворяли в 30-50 мкл стерильной бидистиллированной воды и использовали сразу после выделения.

### **Амплификация фрагментов генома с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР**

Обратную транскрипцию (ОТ) проводили либо с использованием ревертазы Superscript II (Invitrogen) и случайных гексануклеотидов (MWG, Германия), либо с использованием наборов Reverta-L («Амплисенс», Москва) согласно инструкции производителя. В реакцию брали 10-20 мкл. очищенной РНК. После инкубации в течение 60 мин при 37°С, 2,5 мкл. полученной ОТ-смеси использовали в качестве матрицы в ПЦР.

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл. с использованием ДияТаq ДНК полимеразы (Амплисенс, Москва) и необходимыми праймерами. Перечень использованных в работе праймеров а также соответствующие размеры ампликонов и температуры отжига приведены в табл. 3-3.

После завершения ПЦР продукты анализировали в агарозном геле, положительные образцы очищали, измеряли концентрацию ДНК ПЦР-продуктов и использовали для прямого секвенирования.

## **Секвенирование**

Для секвенирования полногеномных последовательностей ВКЭ был разработан набор из 67 промежуточных праймеров, универсальных для всех субтипов ВКЭ (табл. 3-4). 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 (Иркутск), либо с использованием коммерческого сервиса («Синтол», Москва).

## **Филогенетический анализ**

Нуклеотидные последовательности образцов от каждого повтора ОТ-ПЦР сравнивали между собой и составляли консенсусную последовательность образца, которую использовали для дальнейшего анализа. Для сравнительного анализа нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей использовали элайнмент 320 нуклеотидных последовательностей фрагментов гена белка Е-ВКЭ и «клещевых» флавивирусов, опубликованных в GenBank.

**Таблица 3-3.** Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генома клещевых микроорганизмов

Микроорганизм	ген	праймеры	Ta, °C	Фрагмент, н.о.	Источник
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	16S rRNA	Bb-rrs 11F 5'-GTGCGTCTTAAGCATGCAAGTCAA-3' Bbsl-rrs-519R 5'-CCGAACAACGCTCGCCCCCTTA-3' 1770 5'-TGGCAGTGCGTCTTAAGCATG-3' 1838 5'- AGTACGGCTACCTTGTTACGAC -3'	63 56	500 1462	Эта работа
	Межгенный спейсер 5S-23S rRNA	RS1 5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3' RS2 5'-TCCTCGGCATTCACCATA-3'	50	248-271	Takada N. и др., 2001
	OspA	pA3 (F) 5'-CTATTTGTTATTTGTTAATCTTATAC-3' pA4 (R) 5'-GCAAATCCTAGTAAATATTGTTTC-3' pA6 (R) 5'-ATTGGCTAATGCCTTGACAGGATG-3'	50	819 - 828	Фоменко Н.В. и др, 2009
	P83/100	Fb3 5'-TAGATTATAATTAATTTATAGGAG-3' Fb2 5'-ACTGCTTATCAACTTTAGGAGAAC-3' Fb7 5'-TTCAAAGGGATACTGTTAGAGAG-3' Fb8 5'-AATTCCATATCGCTCAATACCTTC -3' Fb7 5'-TTCAAAGGGATACTGTTAGAGAG-3' Fb6 5'-TGGGAGCAGGGGATGCTG-3'	50	1992-2103	Фоменко Н.В. и др, 2010
<i>Rickettsia sp.</i>	rOmpA	rick33f 5'- GCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGC -3' rick532r 5'- TGCAGCATTCGCTCCCCCTAAAG-3'	56	500	Беликов и др., 2001
Сем. <i>Anaplasmataceae</i>	16SrRNA	Ap-F1 5'-TCCTGGCTCAGAACGAACG-3' Ap-R1 5'- CCTACAGCTACCTTGTTACG-3' EHR 16SD 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' EHR 16SR 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	50	1455 345	Inayoshi M., и др., 2004; Parola P. и др., 2001
Вирус клещевого энцефалита	E	TBEV-1089f 5'-YTCRATGGAYGTGTGGCTTGA-3' TBEV 1643R 5'-GCCAGATCATTRAACCAGTC-3'	60	554	Эта работа
	5'UTR-C-prM-E	TBEV 1F 5'-AGATTTTCTTGCRCGTGC-3' TBEV 3836R 5'-ACCATCTCTCKGACRGTGAG-3'	50	3836	Эта работа

Перечень номеров доступа использованных в работе последовательностей может быть предоставлен по запросу. Для редактирования и анализа последовательностей использовали инструменты программы BioEdit разных версий по мере апдейта программы.

**Таблица 3-4.** Праймеры, использованные для секвенирования геномов ВКЭ

Название	Последовательность, 3'-5'	Длина	Tm(°C)	CG(%)
3`42	agcgggtgttttccgagtcacwcatcacctcctgtcagac	42	68-74	52,4
tbe3`14	agcgggtgttttcc	15	49,4	53,3
tbe3` consr	agcgggtgttttccgagt	19	56,7	52,6
tbe5` consf	ccagatttcttgcrctg	19	53,5	50
tbe5` longf	agatttcttgcrctgcrctgcgttgcttcgg	33	67	51,5
tbe-5293-f	gtggrctyaargaaatgga	20	51,1	42,5
tbe-5872-r	acctcytcvggyttgatgtttgt	23	57,6	46,3
tbe3`-13r	aaggaggtgatgwtgactcggaacacccg	33	65,5	51,5
5230-r	ggaggactctgtgggtctcc	21	58,8	61,9
5230-r-rt	ctctgtgggtctcc	15	47,9	60
1f	agatttcttgcrctgc	18	52,6	47,2
565f	cacctgtgtgathctggc	18	54	57,4
1089f	ytcratggaygtgtggcttga	21	56,7	50
1624f	gactggttyaatgatctggc	20	52,4	47,5
2212f	acagtgatmggrgarcacgcctg	23	61,5	56,5
2817f	ggccantcartgatctggag	20	55,3	55
3342f	grggrgcwtctgtgaggag	19	56,8	63,2
3817f	ctcacygctcmgagagatgggt	20	55,4	52,5
4357f	gtkgcygaatggagtggctg	20	58,8	60
4864f	gaggaraartggaaggtga	20	52	45
5293f	gtggrctyaargaaatgga	20	51,1	42,5
5872f	gtgagccgygtyatagatgg	20	55,3	55
6408f	gttyaragarggacgtgacatca	23	55,3	45,7
6937_f	aaggcrgayytgtccac	17	53,1	55,9
w_6888_f	ccttgctggactggttcag	20	58,8	60
s_6877_f	actctctgcagctggtgg	20	58,6	60
fe_6931_f	agacyaaggcggacctgtc	19	57,4	60,5
7627_f	gggcaymgrctctggct	17	58,3	64,7
fe_7427_f	cctggcttrgcatagtg	20	56,4	57,5
s_7469_f	tgaacagaacggtggtcc	20	57,5	55
8305_f	aggaaytcmaccatgaratga	23	54,4	39,1
8908_f	gatgagcaraacagrtgg	18	50,7	50
9502_f	acccthacyaacataaaggt	20	50,1	39,2
10124_f	tggacaayccytcatgca	19	54	47,4

**Таблица 3-4. Праймеры, использованные для секвенирования геномов ВКЭ**  
(окончание)

Название	Последовательность, 3'-5'	Длина	Tm(°C)	CG(%)
11154_r	agcgggtgttttccg	16	52,8	56,3
10142_r	tgcataaarggrttgtcca	19	54	47,4
9521_r	accttatgttrgttaggggt	20	50	39,2
8925_r	ccauctgttytgctcatc	18	50,7	50
8327_r	tacatytcatgggtkgarttcct	23	54,4	41,3
7643_r	agccagagyckrtgccc	17	58,3	67,6
6953_r	gtggacarrtcygcctt	17	53	55,9
6430_r	tgatgtcacgtccytctytraac	23	55,4	45,7
5891_r	ccatctatracrggctcac	20	55,2	55
5312r	tccatttcytragyaccac	20	51,1	42,5
4883r	tcacctttccaytctcctc	20	52	45
4376r	cagccactccattcrgcmac	20	58,8	57,5
3836r	accatctctckgacrgtgag	20	55,4	55
3470r	cgtatttccatggcatacca	20	52,4	45
3362r	ctcctcacagawgcyccyckt	21	59,1	59,5
2837r	ctccagatcaytgantggccc	21	57,6	57,1
2234r	caggcgtgytcyckatcactgt	23	61,5	58,7
1643r	gccagatcattraaccagtc	20	52,3	47,5
1083r	cacacrtccatygarggcttc	21	57,1	54,8
584r	gccagdatcacacaggtgcc	20	59,4	61,7
TBEV-4961_F	acacagggagaaggatgggagcag	24	62,6	58,3
TBEV-5178_F	aatcacagtgtggacatgca	21	57,9	47,6
TBEV-5825_F	actttgtggtgacgaccgac	20	57,7	55
TBEV-6265_F	gtgtccagtgtgacaagccga	21	59,9	57,1
TBEV-6804_F	gctaacggtgttgacgcctgaggc	24	64,5	62,5
TBEV-8787_F	catgagagcggatgaatgactgg	22	57,9	54,5
TBEV-10072_F	gcttggatgaccacagaggac	21	57,8	57,1
TBEV-5488_R	gatctgtccaatgggcttcgt	21	57,6	52,4
TBEV-6265_R	tcggctgtcacactggacac	21	59,9	57,1
TBEV-6492_R	cgacattcctgtcagcacgtc	21	58,1	57,1
TBEV-7325_R	acctgtgggctcttctgtc	21	58	52,4
TBEV-9800_R	gtgtgaacagaatgggacctc	21	55,6	52,4
TBEV-10630_R	gcgtgtgccgtggtgcac	19	62,8	68,4

Идентификацию вирусов и микроорганизмов а также выявление эволюционных и эколого-географических взаимосвязей производили с помощью филогенетического анализа расшифрованных фрагментов. Филогенетический анализ проводили 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 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].

### **Титрование ВКЭ по бляшкообразующим единицам и морфология бляшек**

Серийные десятикратные разведения суспензии ВКЭ в RPMI 1640 без добавления ЭТС наносили на монослой клеток СПЭВ в соответствующие лунки 24-луночной планшеты. Объем инокулята составлял 250 мкл. После 1 ч. адсорбции при 37°C, инокуляты удаляли а клетки заливали средой поддержки (RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, 2% ЭТС и 1% агарозы SeaPlaque (Cambrex). Планшеты остужали до комнатной температуры в течение 30 мин. и инкубировали в течение 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации клетки фиксировали 4% формальдегидом, промывали водой и окрашивали 0,05% раствором кристаллического фиолетового.

### **Оценка цитопатического действия ВКЭ в культуре клеток СПЭВ**

Полностью сформированные монослои клеток СПЭВ в 24-луночных планшетах инфицировали соответствующим штаммом ВКЭ с множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку (МИ=1). После 1 ч. адсорбции при 37°C, инокуляты удаляли а клетки заливали средой поддержки (RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, 2% ЭТС) и инкубировали в течение 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации клетки фиксировали 4% формальдегидом, промывали водой и окрашивали 0,05% раствором кристаллического фиолетового. Окрашенные клетки

промывали водой, тщательно удаляли избыток влаги и высушивали на воздухе при комнатной температуре. После этого производили визуальную оценку цитопатического действия, монослои фотографировали. Для оценки количества жизнеспособных клеток, каждую лунку экстрагировали метанолом и измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 590 нм. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение оптической плотности экстрактов инфицированных монослоев к оптической плотности лунок с незараженными клетками и выражали в процентах. На каждой экспериментальной планшете были предусмотрены 4 независимые лунки отрицательного контроля (незараженные клетки). Каждый тест также проводился в 4 независимых повторях, на основе которых рассчитывали средние значения и 95% доверительный интервал.

### **Оценка стабильности вирионов ВКЭ**

Для оценки влияния физических условий при проведении экспериментальных процедур, мы подвергли идентичные аликвоты 2 контрольных (Vs IC и Hypr IC) и 2 рекомбинантных (Vs [Hypr str] и Hypr [Vs str]) штаммов ВКЭ воздействию физических условий, имитирующих экспериментальные или более экстремальные. Для каждого штамма ВКЭ было приготовлен и заморожен при  $-80^{\circ}\text{C}$  исходный сток из 50 идентичных аликвот по 0,5мл суспензии. В качестве контрольного значения использовалась аликвота исходного стока ВКЭ, хранившаяся без единой разморозки при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение всего эксперимента. Условие «однократное замораживание» - аликвоту ВКЭ оттаивали при комнатной температуре, повторно замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили до титрования; «6-кратное замораживание» - цикл замораживание-оттаивание повторяли 6 раз, замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили до титрования; «6-кратное замораживание, 48ч. при  $37^{\circ}\text{C}$ » - аликвоту ВКЭ после 6 циклов замораживание-оттаивание инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч.; «40 мин при  $+40^{\circ}\text{C}$  и 40 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ » - 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, на основе которых рассчитывали средние значения и 95% доверительные интервалы.

### **Оценка динамики репродукции ВКЭ в культуре клеток СПЭВ**

Монослой клеток 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 ежесуточно до 72 часов после заражения. Эксперимент проводили в 3 независимых повторах.

### **Оценка эффективности неvirемической трансмиссии (ЭТ) и репродукции (ЭР) ВКЭ в клещах *I. ricinus***

Ненапивавшихся самок *I. ricinus* заражали ВКЭ с помощью стереомикроскопа Wild M 400 (Wild Heerbrugg AG, Switzerland) в коксу второй пары ног с использованием цифрового микроинжектора MINJ-D-CE (Tritech Research, Inc.; USA). Инъекционное давление составляло ~1.38 Атм. и создавалось чистым азотом. Инъекционный интервал составлял 1 сек. Для инъекций использовали стеклянные иглы, изготовленные с помощью вытягивателя микропипеток P-30 Micropipette puller (Sutter Instrument Company, USA).

Эксперименты по неvirемической трансмиссии ВКЭ проводили в соответствии с ранее описанными методами [Labuda М. и др., 1996; Labuda М. и др., 1997; Jones L.D. и др., 1997] с модификациями. Группу самок заражали соответствующим штаммом ВКЭ и инкубировали в эксикаторе при отн. влажности 80-90% и температуре воздуха 24±4°C в течение 14 дней.



Для каждого эксперимента, 2 зараженные самки присаживали для питания на мышей (линия Balb/C) и одновременно в непосредственной близости (1-1,5 см.) присаживали для питания 15 незараженных нимф *I. ricinus*. Зараженных и незараженных клещей оставляли совместно питаться в течение 3 дней. Выживших к этому времени 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 производили не менее 4 независимых повторов.

Мышей-прокормителей наблюдали в течение 21 дня после прикрепления клещей-доноров, регистрировали время гибели и забирали образцы сыворотки крови для оценки уровня смертности, средней продолжительности жизни (СПЖ) и серологического подтверждения факта заражения ВКЭ. Выживших через 21 день мышей подвергали эвтаназии и забирали образцы сыворотки крови для серологического подтверждения факта заражения ВКЭ.

Эксперименты с лабораторными животными проводили в Институте вирусологии АН Словакии (Братислава) в соответствии с руководствами по работе с животными (Act of the Government of the Slovak Republic 2003 regulating the use of experimental animals) и с разрешения этического комитета института вирусологии. Все эксперименты были одобрены State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic (разрешения № 12284/03-220 и № 2362/06-221).

### **Статистическая обработка данных**

Для каждого набора экспериментальных или учетных данных рассчитывали среднее значение и стандартный набор показателей описательной статистики – стандартное отклонение, стандартную ошибку, 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 Прибайкалье и Монголии как фактор формирования стабильных популяций микроорганизмов в специфических эколого-географических условиях**

Полиморфизм популяций возбудителей инфекционных заболеваний является одной из интереснейших и важнейших проблем современной инфектологии. Сравнительный анализ генетической variability микроорганизмов в свою очередь является одним из наиболее информативных и доступных подходов к исследованию разнообразия патогенов.

Изучение генетического разнообразия популяций возбудителей клещевых инфекций позволяет выявить появление новых форм микроорганизмов, оценить их опасность для человека, установить пути миграции патогенов в ходе эпидпроцесса, усовершенствовать средства детекции и идентификации возбудителей с целью адекватной диагностики и своевременной профилактики заболеваний. В научном плане, сведения о структуре генома микроорганизмов имеют большое значение для определения их географического распределения, взаимосвязей с другими компонентами паразитарной системы, популяционных и эколого-эпидемиологических характеристик природных очагов, механизмов возникновения и развития вызываемых этими микроорганизмами заболеваний.

В Прибайкалье и на сопредельных территориях установлен не только широкий спектр возбудителей, переносимых клещами, но и значительный внутривидовой полиморфизм. В популяциях *I. persulcatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli* в природных очагах Иркутской области и Монголии циркулируют возбудители клещевых инфекций, разнообразные по природе и генетическим характеристикам.

#### 4.1. Генетическая вариабельность ВКЭ

В ходе исследований разнообразия ВКЭ в Восточной Сибири и Монголии нами были использованы как собственные данные, так и опубликованные нуклеотидные последовательности ВКЭ. В результате выборка изолятов ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии составила в целом 39 нуклеотидных последовательностей фрагмента белка Е, из которых 8 вирусов были изолированы в Монголии и 31 – в Иркутской области, Красноярском крае и Республике Бурятия (Табл. 4-1). Из них нами были расшифрованы 7 изолятов ВКЭ из Монголии и 6 – из Иркутской области. Остальные были опубликованы разными авторами в базе данных GenBank.

Для максимально репрезентативного анализа разнообразия ВКЭ нами был использован фрагмент гена Е длиной 339 н.о. кодирующий позиции 108 – 220 белка Е и захватывающий основные аминокислотные маркеры субтипов ВКЭ. Данный фрагмент уникален в том плане, что он позволяет проанализировать генетическое разнообразие беспрецедентно большого количества изолятов ВКЭ, поскольку перекрывается с большинством нуклеотидных последовательностей гена Е, опубликованных в настоящее время в открытом доступе (GenBank, EMBL и др.). Так, по состоянию на октябрь 2014 г., из 1051 нуклеотидных последовательностей ВКЭ, возвращенных сервисом Nucleotide NCBI по запросу “tick-borne encephalitis envelope”, 829 (79 %) содержали исследуемый фрагмент. В анализ филогеографических связей ВКЭ были включены фрагменты гена Е 824 индивидуальных изолятов ВКЭ, из которых 776 были представлены в единичном варианте, а остальные 48 были изолированы из двух или трех источников. Нуклеотидные последовательности были аннотированы в соответствии с регионом изоляции (см. табл. 4-1) и субтиповой принадлежностью.

**Таблица 4-1.** Характеристика доступных нуклеотидных последовательностей ВКЭ из Иркутской области, Республики Монголия и сопредельных регионов РФ

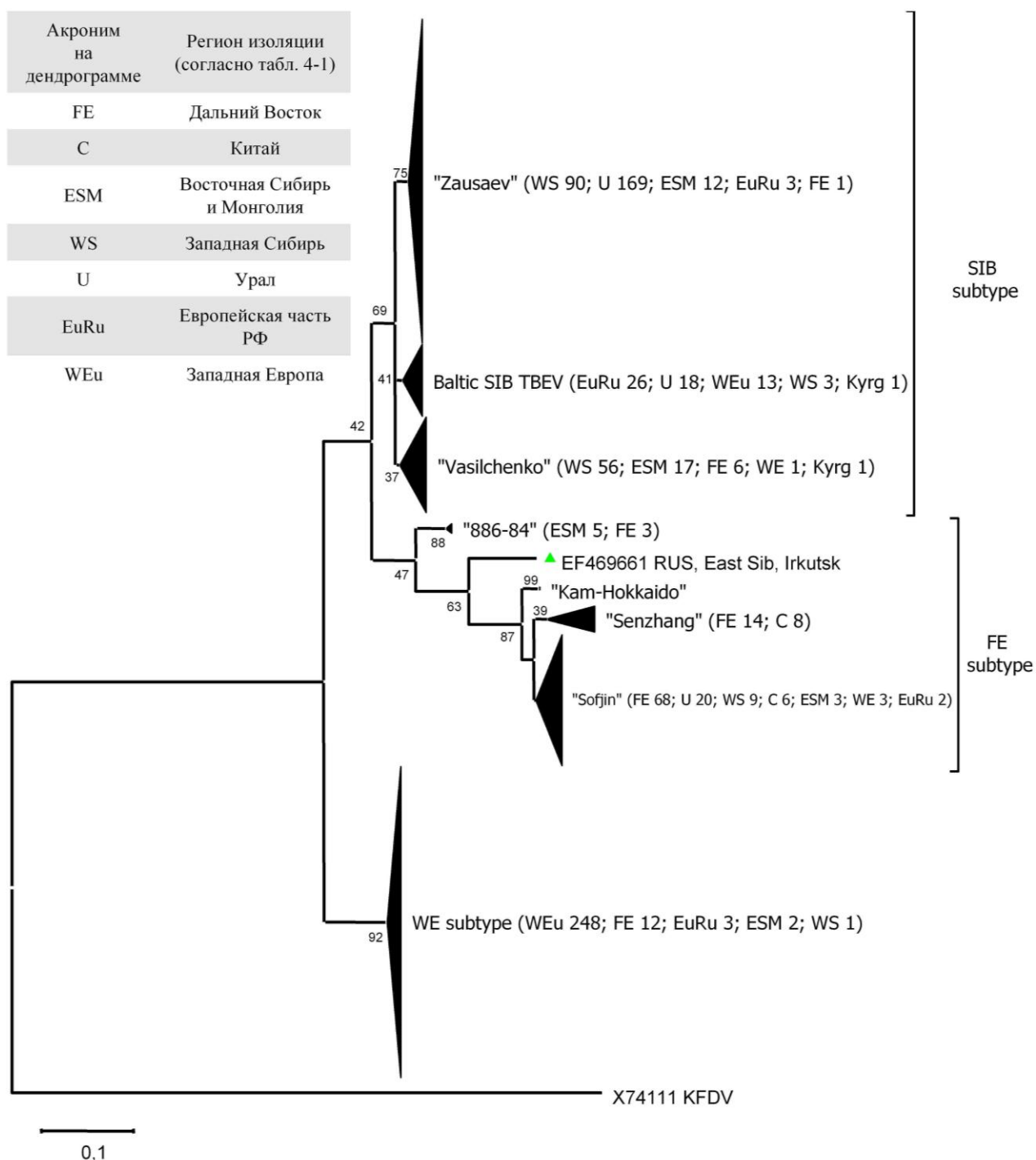
Образец	Источник изоляции	Год изоляции	Географическое место изоляции	Номер доступа GenBank	Ссылка
MNG 92M	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	HM133640	Это исследование
MNG 940M	<i>I. persulcatus</i>	2002	Монголия	KP666095	Это исследование
MNG Ip290\2-2005	<i>I. persulcatus</i>	2005	Монголия	KP666090	Это исследование
MNG Ip283\9-2005	<i>I. persulcatus</i> ,	2005	Монголия	KP666091	Это исследование
MNG TBEV-MN-2008	<i>Homo sapiens</i> , менингеальная форма КЭ	2008	Монголия	HM133639	Это исследование
MucAr M14/10	<i>I. persulcatus</i>	2012	Монголия	JQ429588	S. Frey, 2013
MNG D13-15	<i>I. persulcatus</i>	2013	Монголия	KP666093	Это исследование
MNG D13-37	<i>I. persulcatus</i>	2013	Монголия	KP666094	Это исследование
Aina	<i>Homo sapiens</i> , хронический ТБЕ	1963	Иркутская область	AF091006	Ecker, 1999
Irkutsk-134-71	<i>Citellus undulatus</i>	1971	Иркутская область	FJ214155	Karan, 2008 (не опубл.)
Irkutsk-112-79	Н.И.	1979	Иркутская область	FJ214156	Karan, 2008 (не опубл.)
178-79	<i>I. persulcatus</i>	1979	Иркутская область	EF469661	Karan, 2008 (не опубл.)
352-81	<i>Cricetulus barabensis</i>	1981	Бурятия	AF224667	Karan, 2008 (не опубл.)
740-84	<i>Myodes rufocanus</i>	1984	Бурятия	EU878282	Karan, 2008 (не опубл.)
711-84	<i>M. rufocanus</i>	1984	Бурятия	EU878281	Karan, 2008 (не опубл.)
886-84	<i>M. rufocanus</i>	1984	Иркутская область	EF469662	Karan, 2008 (не опубл.)
Stolby-4	<i>I. persulcatus</i>	1988	Красноярский край	AF231807	Adelshin, 2014 (не опубл.)
Stolby-1	<i>I. persulcatus</i>	1988	Красноярский край	AF224666	Adelshin, 2014 (не опубл.)
617-90	<i>I. persulcatus</i>	1990	Бурятия	EU878283	Karan, 2008 (не опубл.)
IRK 1G-98	<i>Homo sapiens</i> , лихорадочная форма КЭ	1998	Иркутская область	KP666097	Это исследование, Верхозина и др., 2007
IR99-2f13	<i>I. persulcatus</i>	1999	Иркутская область	AB049353	Nayasaka, 2001
IR99-2f7	<i>I. persulcatus</i>	1999	Иркутская область	AB049352	Nayasaka, 2001
IR99-2m3	<i>I. persulcatus</i>	1999	Иркутская область	AB049350	Nayasaka, 2001
IR99-1m4	<i>I. persulcatus</i>	1999	Иркутская область	AB049349	Nayasaka, 2001
IR99-1m1	<i>I. persulcatus</i>	1999	Иркутская область	AB049348	Nayasaka, 2001
IRK 3869-03	<i>Homo sapiens</i> , инвазивный КЭ	2003	Иркутская область	KP666098	Это исследование, Верхозина и др., 2007

**Таблица 4-1 (окончание).** Характеристика доступных нуклеотидных последовательностей ВКЭ из Иркутской области, Республики Монголия и сопредельных регионов РФ

Образец	Источник изоляции	Год изоляции	Географическое место изоляции	Номер доступа GenBank	Ссылка
IRK 413-04	<i>Homo sapiens</i> , менингеальная форма КЭ, двухволновое течение	2004	Иркутская область	KP666099	Это исследование, Верхозина и др., 2007
IRK 2517-05	<i>Homo sapiens</i> , хронический КЭ	2005	Иркутская область	KP666096	Это исследование, Верхозина и др., 2007
Irkutsk-48-06	<i>Microtus oeconomus</i>	2006	Иркутская область	FJ214157	Karan, 2008 (не опубл.)
Irkutsk-1861	<i>Homo sapiens</i> , мозг	2008	Иркутская область	JN003205	Kulakova, 2012
IRK 38-2009	<i>I. persulcatus</i>	2009	Иркутская область	KP666092	Это исследование
IRK Ip5\70-2010	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KP666089	Это исследование
Irkutsk-12	<i>Homo sapiens</i> , кровь	2010	Иркутская область	JN003209	Kulakova, 2012
1047-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KC417478	Adelshin, 2014 (не опубл)
834-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KC417477	Adelshin, 2014 (не опубл)
542-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KC417476	Adelshin, 2014 (не опубл)
127-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KC417475	Adelshin, 2014 (не опубл)
116-10	<i>I. persulcatus</i>	2010	Иркутская область	KC417474	Adelshin, 2014 (не опубл)
Irkutsk_BR_683-11	<i>I. persulcatus</i>	2011	Иркутская область	KF823822	Adelshin, 2014 (не опубл)

Оптимальной эволюционной моделью (см. «Материалы и методы») оказалась двухпараметрическая модель Кимуры с неравномерной скоростью эволюции между сайтами описываемой параметром гамма-распределения  $G = 0,4$ . Топологию древа определяли независимо с помощью методов Maximum Likelihood и Neighbour-Joining, достоверность кластеризации оценивали с помощью бутстреп анализа на основе 100 псевдовыборок. Для независимой оценки валидности анализа также использовали 5-параметрическую модель Тамуры-Нея TN93 [Tamura and Nei, 1993]. В расчет принимали только те кластеры, которые воспроизводились независимо от эволюционной модели или метода анализа, а также имели бутстреп-поддержку не менее 30 %.

На филогенетическом древе (рис. 4-1) 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 Е-ВКЭ субтип. Общая топология древа совпадала с ранее опубликованными реконструкциями на основе полноразмерного гена Е [Hayasaka D, 2001; Gritsun, 2003a; 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. 4-2). Так, из 80 вирусов линии «Васильченко» СИБ-ВКЭ, 90 % обитали на территории Западной (70 %) и Восточной Сибири - Монголии (20 %). При этом ВКЭ этой линии не были обнаружены ни в Китае, ни на Урале, ни в Европейской части РФ, несмотря на сопоставимые или превосходящие объемы выборки последовательностей ВКЭ из этих регионов (14, 207, 34 изолятов). На Дальнем Востоке, при сравнимом объеме выборки в 104 вируса, обитало 7,4 % ВКЭ этой линии, тогда как в Западной Европе из 265 исследованных изолятов лишь один относился к линии «Васильченко» СИБ-ВКЭ (1,2 % от всей линии).



**Рисунок 4-1. Филогеографические ассоциации 824 изолятов ВКЭ реконструированы на основе анализа фрагмента гена Е локализованного между позициями генома 1293-1549 н. о. (в нумерации ВКЭ «Васильченко» AF069066). Анализ проводился методом Maximum Likelihood с использованием двухпараметрической модели эволюции Кимуры [Kimura, 1980]. Достоверность узлов оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 псевдовыборок. Шкала отражает эволюционную дистанцию равную 0,1 замене на сайт. В качестве аутгруппы использовали нуклеотидную последовательность вируса Киассанурской лесной болезни (KFDV). Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 6 [Tamura, 2013]. Изоляты из Восточной Сибири и Монголии обозначены зеленым треугольником. Коллапсирование кластеров производили при уровне бутстреп поддержки не менее 30 %. Регион обитания и количество**



изолятов ВКЭ в каждом кластере приведены слева от названия кластера. Расшифровка акронимов регионов изоляции приведена в таблице в левом верхнем углу рисунка.

Подобная ситуация наблюдается в каждой эволюционной линии ВКЭ – порядка 90 % всех известных вирусов отдельной линии обитали в 2-3 сопредельных эколого-географических регионах (табл. 3-1), при этом более 60 % изолятов каждой линии были обнаружены в одном специфичном регионе (табл. 5-2).

**Таблица 4-2.** Ассоциация эволюционных линий ВКЭ с регионом обитания

Эволюционная линия	Общее кол-во 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	<b>61,5</b>	1,1	0,0	0,0
СИБ-ВКЭ «Балтийская»	61	0,0	0,0	0,0	4,9	29,5	<b>42,6</b>	21,3	1,6
СИБ-ВКЭ «Васильченко»	80	7,5	0,0	20,0	<b>70,0</b>	0,0	0,0	1,3	1,3
ДВ-ВКЭ «886-84»	9	33,3	0,0	<b>66,7</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ДВ-ВКЭ «Senzhang»	22	<b>63,6</b>	36,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ДВ-ВКЭ «Софьин»**	111	<b>61,3</b>	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	<b>93,2</b>	0,0

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

\* - Акронимы регионов приведены в соответствии с табл. 3-1.

\*\* - В линию «Софьин» включены 2 изолята группы «Kam-Hokkaido», которые формировали отдельную линию на филогенетическом древе (рис. 4-1)

Среди 39 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» (табл. 5-3). 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 (табл. 4-3).

**Таблица 4-3.** Разнообразие ВКЭ в Восточной Сибири и Монголии  
(по результатам анализа 39 изолятов)

	СИБ-ВКЭ*			ДВ-ВКЭ**			ЗЕ ВКЭ
	«За...»	«Б...»	«Вс...»	«886-84»	«S...»	«Соф...»	
Доля каждой линии среди ВКЭ, обитающих на территории Вост. Сиб. и Монголии, %	30,8	0,0	<b>41,0</b>	15,4	0,0	7,7	5,1

\* - «За...» - эволюционная линия «Заусаев» СИБ-ВКЭ; «Б...» - эволюционная линия «Балтийская» СИБ-ВКЭ; «Вс...» - эволюционная линия «Васильченко» СИБ-ВКЭ

\*\* - «886-84» эволюционная линия «886-84» ДВ-ВКЭ; «S...» эволюционная линия «Senzhang» ДВ-ВКЭ; «Соф...» эволюционная линия «Софьин» ДВ-ВКЭ

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 4-2 В, С, D и E). Можно предположить, что на территории Восточной Сибири и Монголии циркулируют близкородственные популяции ВКЭ, а также, что в экосистемах бассейнов рек Селенга и Ангара идет постоянный обмен вирусными штаммами, а циркуляция штаммов ВКЭ, свойственных сопредельным регионам, ограничена.

Востоносибирские и монгольские изоляты СИБ-ВКЭ, вошедшие в эволюционную линию «Заусаев» имели два выраженных типа кластеризации. Четыре из них, а именно IRK Ip5\70-2010, MucAr M14/10, 542-10 и 127-10, кластеризовались независимо друг от друга с различными ВКЭ линии «Заусаев», изолированными в Западной Сибири и на Урале. Типичный вариант подобной кластеризации представлен на рис. 5-2А. Оставшиеся восемь изолятов образовали единый кластер монофилетического происхождения с выраженными признаками радиальных эволюционных процессов, что проявлялось в разных длинах ветвей для вирусов, изолированных в удаленных географических локациях и в разное время с 1988 по 2010 гг. (рис 4-2 В и табл.

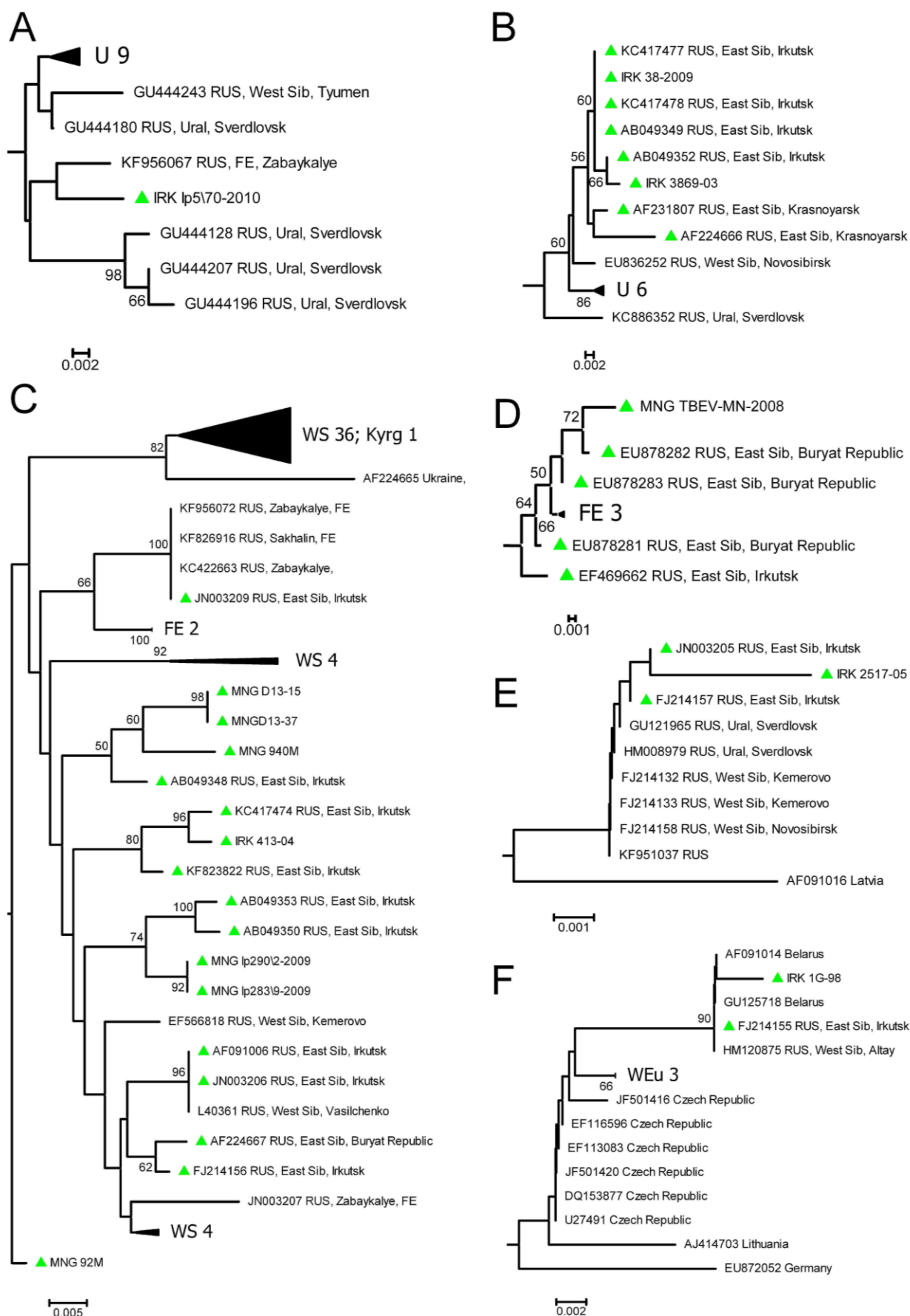
4-1). Можно предположить, что эти восемь изолятов ВКЭ представляют собой вариант СИБ-ВКЭ «Заусаев», адаптировавшийся к экосистемам Восточной Сибири. Это предположение подтверждается результатами трех независимых групп исследователей, которые регулярно на протяжении 1988-2010 гг. обнаруживали этот вариант ВКЭ на обширной территории от Красноярского края до г. Иркутска (табл. 4-1). Вероятно, остальные четыре вируса этой линии, попав в Восточную Сибирь или Монголию, оказались неспособны сформировать стабильные популяции и встречались в единичных экземплярах в ограниченный период времени. От человека в Восточной Сибири был изолирован только один вирус этой линии – IRK 3869-03 – причем в данном случае имела место инapparантная инфекция без признаков заболевания [Верхозина М.М., 2007], что согласуется с общепринятым представлением о низкой патогенности СИБ-ВКЭ для человека [Gritsun, 2003rew].

Среди 17 изолятов эволюционной линии «Васильченко» СИБ-ВКЭ 16 формировали гетерогенную группу, в которую помимо восточносибирских и монгольских изолятов также входили 10 изолятов из Западной Сибири и 6 ВКЭ из разных частей дальневосточного региона (рис. 5-2 С). Этот кластер имеет признаки наиболее высокой адаптированности к экосистемам Восточной Сибири и Монголии. Например, именно в этом кластере сгруппировалось наибольшее количество изолятов, полученных в разные годы независимыми группами исследователей по всей территории обследуемого региона. Также, для этой группы изолятов характерен высокий уровень внутригруппового полиморфизма, что проявляется в существенно большей длине ветвей внутри группового кластера. Изолят MNG 92M, относящийся к линии «Васильченко» СИБ-ВКЭ, существенно отличался от остальных представителей линии и сформировал отдельную ветвь. Интересно, что данный вирус был изолирован на южной границе ареала клещей *I. persulcatus* в Монголии и, следовательно, может быть представителем локально адаптированной группы штаммов линии «Васильченко». Однако, статистическая поддержка данной ветви низкая (менее 20 %), что не позволяет с уверенностью говорить о достоверности данного

заклучения. Кроме того, выборка изолятов ВКЭ из Монголии невелика, поэтому затруднительно оценить реальную распространенность и устойчивость циркуляции подобных вирусов. Из 17 восточносибирских вирусов этой линии, изоляты Irkutsk-12 и IRK 413-04 были получены от больных людей. Интересно, что IRK 413-04 вызвал КЭ в менингеальной форме с двухволновым течением (табл. 3-1). Подобное клиническое проявление инфекции считается более характерным для Е-ВКЭ, однако данный случай показывает, что данная симптоматика не является субтип-специфичной.

ДВ-ВКЭ в Восточной Сибири и Монголии представлен как типичными Софьин-подобными вирусами, так и изолятами линии «886-84» (рис. 4-2 D и E). ДВ-ВКЭ линии «Софьин» образовали монофилетический кластер, при этом наиболее близкородственные вирусы были изолированы в Западной Сибири и на Урале (рис. 4-2E). Восточносибирские ДВ-ВКЭ линии «Софьин» были изолированы либо от красно-серой полевки (Irkutsk-48-06), либо от больных людей (Irkutsk-1861 и IRK 2517-05) на протяжении короткого промежутка времени (2005 – 2008 гг). Наблюдался полиморфизм клинических проявлений инфекции у людей. Так, изолят Irkutsk-1861 был получен из мозга погибшего больного с очаговой формой заболевания, а изолят IRK 2517-05 – от больного с хроническим КЭ.

Линия «886-84» сформирована изолятами из Иркутской области, Бурятии, Монголии и сопредельных регионов (Читинская область). Кроме того, несмотря на значительные отличия в нуклеотидной структуре, к этой линии близок изолят 178-79 из Иркутской области, сформировавший отдельную ветвь на общем древе (табл. 3-1, рис 4-1).



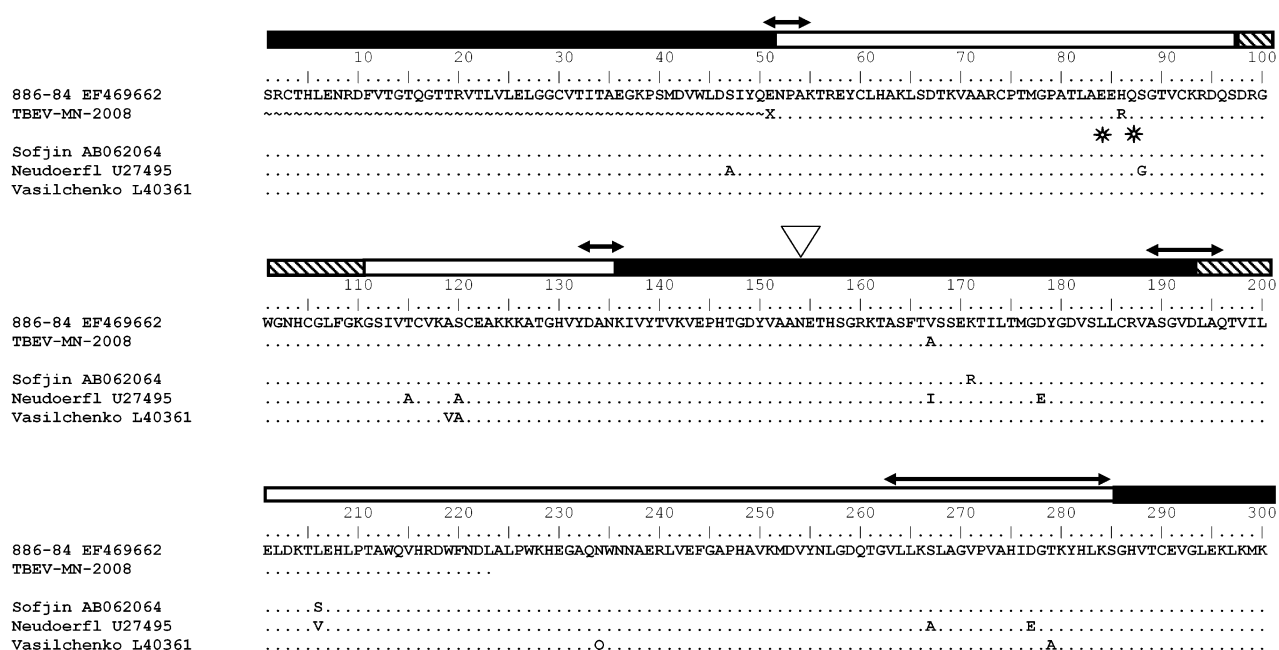
**Рисунок 4-2. Дендрограммы эволюционных взаимоотношений ВКЭ из Прибайкалья и Монголии (См. легенду на след. стр.).**

**Рисунок 4-2 (легенда).** Кластеры, содержащие ВКЭ из Восточной Сибири и Монголии (в соответствии с табл. 4-1.) были экстрагированы из филогенетического древа, приведенного на рис. 5-1. Панели **А** и **В** – ВКЭ группировавшиеся в пределах линии «Заусаев» СИБ-ВКЭ; **С** – линия «Васильченко» СИБ-ВКЭ; **Д** – линия «886-84» ДВ-ВКЭ; **Е** – линия «Софьин» ДВ-ВКЭ; **Г** – кластер Е-ВКЭ, содержащий ВКЭ из Иркутской области. Эволюционные взаимоотношения 825 изолятов ВКЭ реконструированы на основе анализа фрагмента гена Е локализованного между позициями генома 1293-1549 н. о. (в нумерации ВКЭ «Васильченко» AF069066). Анализ проводился методом Maximum Likelihood с использованием двухпараметрической модели эволюции Кимуры [Kimura, 1980]. Достоверность узлов оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 псевдовыборок. Шкалы эволюционных дистанций отображены для каждого кластера индивидуально и выражены в количестве нуклеотидных замен на сайт. В качестве аутгруппы использовали нуклеотидную последовательность вируса Киассанурской лесной болезни (KFDV). Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 6 [Tamura, 2013]. Изоляты из Восточной Сибири и Монголии обозначены зеленым треугольником. Для каждого таксона указан номер нуклеотидной последовательности в GenBank географическое место изоляции вируса.

Линия 886-84 в настоящий момент является самым малочисленным и редким вариантом ВКЭ (1,09 % из всех изученных нами изолятов ВКЭ), однако обладает выраженным внутригрупповым полиморфизмом. Кроме того, можно отметить, что вирусы линии «886-84» были обнаружены несколькими независимыми группами исследователей на ограниченной территории лесостепных районов Иркутской области, Республики Бурятия, Монголии и Читинской области в течение значительного периода времени с 1979 по 2010 гг. [Карань Л.С. и др., 2007; Демина Т.В. и др., 2009; Adelshin и др., 2014 (нуклеотидные последовательности GenBank, см. табл. 4-1)]. Полученные результаты, вкуче с литературными данными, позволяют предположить, что линия «886-84» представляет собой ДВ-ВКЭ, глубоко адаптировавшийся к экстремальным для него экосистемам Восточной Сибири и способный к устойчивой циркуляции в течение длительного времени на ограниченной территории.

Вирусы линии «886-84», как и ДВ-ВКЭ линии «Софьин», представляют серьезную опасность для здоровья человека. Так, изолят MNG TBEV-MN-2008 выделен нами из мозга погибшего больного с КЭ в менингеальной форме, который был инфицирован на территории Монголии. 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. 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. 4-3). 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 Hopp and Woods [Hopp 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. Мутация V167A не приводит к драматическому изменению свойств белка и расположена на латеральной поверхности Е-белка.



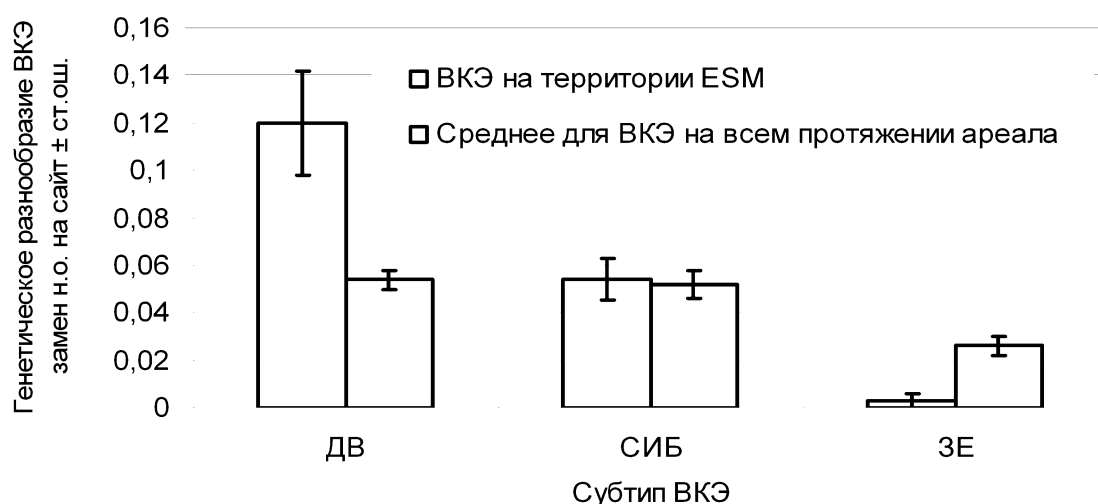
**Рисунок 4-3. Анализ транслированных аминокислотных последовательностей ВКЭ.** Последовательность изолята 886-84 взята как референс. Идентичные аминокислоты в последовательностях изолятов Sofjin (Дальневосточный субтип), Neudoerfl (Западноевропейский субтип) и Vasilchenko (Сибирский субтип) и в последовательности фрагмента TBEV-MN-2008 заменены точками. Структурные домены и некоторые функционально значимые регионы белка Е обозначены над линейкой в соответствии с (Rey, 1995). Домен 1 – черная полоса, домен 2 – белая; позиции четырех

«шарнирных» регионов отмечены черными стрелками; пептид слияния (“fusion peptide”) отмечен штриховкой; сайт гликозилирования обозначен переворнутым треугольником. - сайты мутагенеза при адаптации ВКЭ к иксодовым клещам [Labuda, 1994] и клеточным линиям млекопитающих [Mandl, 2001].

В данной работе впервые описано заболевание человека клещевым энцефалитом, вызванное ВКЭ линии «886-84». Выявленный и охарактеризованный случай особо важен тем, что вирус вызвал не просто заболевание, а тяжелый менингоэнцефалит, приведший к гибели больного. Такой исход мог быть вызван тем, что этот вирус обладает особыми патогенными свойствами, позволяющими не только проникать в мозг человека, но и активно там размножаться, при этом разрушая ткани мозга. Обнаруженная нами аминокислотная замена Н86R локализована в интересном локусе 84-87 а.о., который имеет существенное биологическое значение для адаптации ВКЭ к различным хозяевам. Так, было показано, что мутация белка Е Е84К, приводящая к увеличению позитивного заряда в этом локусе, происходит во время адаптации ВКЭ к организму клеща [Labuda М. и др., 1994]. Мутации в позициях 84 и 87 приводят к формированию дополнительного гликозаминогликан связывающего сайта и происходят при адаптации вируса к некоторым модельным клеточным системам [Mandl С. и др., 2001]. С учетом этих данных можно предположить, что, с одной стороны, патогенные свойства исследуемого вируса обусловлены эффективным размножением вируса в клеще, что обеспечило высокую инфицирующую дозу возбудителя. С другой стороны, увеличение гидрофильности локуса 83-88 белка Е может привести к изменению эпитопа, экспонированного на поверхности вириона. Как следствие, вирус мог приобрести повышенную устойчивость к иммунитету человека, улучшенную способность связываться с клеточным рецептором (коррецептором), более эффективно проникать через мембрану клетки. Благодаря этим свойствам возбудитель оказался способен достичь критических показателей виремии и эффективно преодолеть гематоэнцефалический барьер.



Два изолята Е-ВКЭ, обнаруженные на территории Иркутской области, кластеризовались с ВКЭ из Белоруссии и Алтайского края (рис 4-2F). Изоляты этого кластера Е-ВКЭ имеют монофилетичное происхождение и низкую степень внутригруппового полиморфизма равную  $0,0029 \pm 0,0028$  замены нуклеотидов на сайт (рис. 4-4). Учитывая, что в среднем для Е-ВКЭ субтиповой полиморфизм примерно на порядок выше –  $0,026 \pm 0,004$  замены нуклеотидов на сайт - можно предположить, что эта группа произошла от единственного штамма Е-ВКЭ сравнительно недавно интродуцированного, вероятнее всего из Белоруссии, в восточносибирские экосистемы.



**Рисунок 4-4. Сравнение генетического разнообразия внутри основных субтипов ВКЭ** на территории Восточной Сибири и Монголии (белые блоки) и на всем протяжении ареала (серые блоки). Генетическое разнообразие рассчитывали как усредненные попарные генетические дистанции в отдельных элайнментах СИБ-ВКЭ, ДВ-ВКЭ и Е-ВКЭ, изолированных на соответствующей территории. Расчет производили с помощью программы Mega 6 на основе эволюционной модели TN93 [Tamura K. and Nei M., 1993].

Судить об устойчивости циркуляции этой группы в Восточной Сибири не представляется возможным, так как с одной стороны, два изолята были обнаружены в 1971 и 1998 гг., однако с другой стороны, в наборах изолятов 1999 – 2013 гг. подобные вирусы не встречаются. Для оценки распространенности и устойчивости существования этой линии в Восточной Сибири – Монголии требуется существенное увеличение выборки изолятов

ВКЭ. Кроме этой группы, выявляется еще один случай независимой интродукции Е-ВКЭ в азиатские экосистемы – это ряд изолятов из Южной Кореи, которые относятся к ЗЕ-ВКЭ, изолированы в ограниченный период времени от грызунов и нескольких видов клещей. «Корейская» линия Е-ВКЭ также имеет монофилетическое происхождение и низкий уровень внутригруппового генетического разнообразия ( $0,007 \pm 0,003$  замены нуклеотидов на сайт), что свидетельствует об их недавней эволюционной истории в результате единичного интродукционного события.

В итоге, наиболее реалистичной моделью внутривидовой структуры ВКЭ нам представляется общепринятое на настоящий момент деление на три субтипа с выделением внутри каждого субтипа 1-3 эволюционных линий [Hayasaka D. и др., 2001; Gritsun T.S. и др., 2003za; Карань Л.С. и др, 2007; Golovljova I. и др., 2008; и другие]. Однако, на наш взгляд, структуру субтипа ДВ-ВКЭ необходимо дополнить двумя эволюционными линиями – «886-84» и «Senzhang». В пользу этого говорит, во-первых, однозначное расположение этих ВКЭ внутри кластера ДВ-ВКЭ даже при анализе коротких фрагментов белка Е, во-вторых, высоко достоверное формирование отдельных монофилетических групп внутри этого кластера и, в-третьих, четкая приуроченность каждой из этих линий к определенному географическому региону. Таким образом, ВКЭ можно структурировать как вирус, дифференцированный на 3 субтипа и состоящий из семи основных эволюционных линий – три линии внутри ДВ-ВКЭ («Софьин», «Senzhang», «886-84»), три линии внутри СИБ-ВКЭ («Васильченко», «Заусаев», «Балтийская») и гомогенный Е-ВКЭ представляющий собой единую эволюционную линию.

Разнообразие ВКЭ и анализ генетических и фенотипических свойств различных вариантов вируса является предметом постоянного интереса со стороны ученых разных стран. Интерес к разнообразию ВКЭ в природе вызван несколькими причинами. С точки зрения фундаментальной науки, ВКЭ это типичный флавивирус, и изучение его разнообразия дает важнейшую

информацию о многих сторонах биологии этого чрезвычайно важного в эпидемическом плане семейства вирусов, например, о механизмах эволюции флавивирусов и появления патогенных для человека форм. С другой стороны, информация о генетической вариабельности ВКЭ необходима для оценки эффективности и совершенствования современных вакцин и диагностических препаратов. Исследованиям генетической вариабельности ВКЭ посвящен цикл работ В.И. Злобина с соавторами. На основе обширного анализа генетических свойств изолятов и штаммов (исследовано более 200 вирусов) было выделено шесть генотипов ВКЭ, а именно, 1 (прототипный штамм «Софьин»), 2 («Neudoerfl»), 3 («Айна»), 4 («178-79»), 5 («886-84») и 6 («Вегрина») [Злобин В.И. и др., 2001, 2003мэ; Джигоев Ю.П. и др., 2002; Демина Т.В. и др., 2009]. Авторы делают вывод о доминировании генотипа 3 среди популяций ВКЭ. По результатам нашей работы не нашло подтверждения предположение об абсолютном доминировании сибирского субтипа на всем протяжении ареала ВКЭ - в каждом из обследованных регионов преобладает специфичная эволюционная линия ВКЭ, при этом на половине ареала доминирующая линия не относится к СИБ-ВКЭ. Однако, помимо ДВ-ВКЭ и СИБ-ВКЭ, в Восточной Сибири также были обнаружены вирусы Е-ВКЭ. Изоляты предлагаемых генотипов 4 и 5 по нашим данным входят в субтип ДВ-ВКЭ и формируют единую эволюционную линию «886-84». В ряде исследований Г.Н. Леоновой, В.Б. Локтева, В.А. Тернового по разнообразию ВКЭ на дальнем востоке РФ выделяются 3 группы штаммов – «Софьин-Ошима», «Глубинное 2004» и «Senzhang» [Leonova G.N. и др., 2007; Ternovoi V.A. и др., 2007]. В нашей работе изолят Глубинное 2004, вместе с рядом близкородственных ВКЭ с дальнего востока РФ и Читинской области, присоединился к эволюционной линии «Senzhang». Работы Е.И. Андаева с соавторами по изучению генетической вариабельности 61 штамма ВКЭ показывают, что в Прибайкалье и Забайкалье циркулируют только вирусы сибирского и дальневосточного субтипов, причем в Прибайкалье преобладают вирусы сибирского субтипа (87

%), а в Забайкалье – дальневосточного (61,5 %). Взаимосвязи между субтипом вируса и его патогенными свойствами обнаружено не было [Андаев Е.И., 2009].

В данном исследовании также не было выявлено взаимосвязей между эволюционной историей ВКЭ и клиническими проявлениями инфекции.

В целом, анализ полиморфизма ВКЭ в Восточной Сибири и Монголии показал, что каждая из внутривидовых групп ВКЭ – как основные субтипы, так и внутрисубтиповые линии – 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. Е-ВКЭ адаптирован к экосистемам Западной Европы, и появляется в пределах ареала *I. persulcatus* только в виде единичных заносных популяций («Алтайская» и «Корейская» линии), скорее всего, неспособных к устойчивой циркуляции среди неспецифичных хозяев. 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. Характерными особенностями изучаемого региона являются резко континентальный климат, разнообразие типов ландшафтов - от степных до горнотаежных – а также интенсивное по степени и многообразное по формам хозяйственное освоение. Можно предположить, что исследуемые вирусы возникли в ходе коадаптации нескольких компонентов паразитарной системы природных очагов КЭ Прибайкалья и Монголии. 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.

## **4.2. Полиморфизм возбудителей клещевого боррелиоза**

КБ – одно из самых распространенных природноочаговых заболеваний на территории Северной Евразии [Коренберг Э.И., 1996]. Возбудители КБ – спирохеты, относящиеся к роду *Borrelia*, комплексу *B. burgdorferi sensu lato* (порядок Spirochaetales, семейство Spirochaetaceae). В настоящее время к этой группе относят 15 валидных и 5 кандидатных видов [Wang G, et al. 1997, 1999; Postic, D., et al. 1998. Richter D, et al. 2006] и только три из них достоверно вызывают заболевание человека – *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* и *B. afzelii*, патогенность остальных боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* до конца не выяснена [Busch U. et al., 1996; Canica M.M. et al., 1993].

Ранее было показано, что в азиатской части нозоареала КБ циркулируют следующие виды: *B. garinii* и *B. afzelii*, - в России, Японии, Северо-Восточном и Западном Китае, в Корее; *B. sinica* – в Китае; *B. turdi*, *B. tanukii* и *B. japonica* – в Японии, *B. valaisiana* – на Тайване, в Южных регионах Китая и Японии. На основе различий в структуре генома, *B. garinii* разделяют на 2 группы – Евразийскую (*B. garinii* 20047) и Азиатскую (*B. garinii* NT29). Недавно из *B. garinii* был выделен новый вид *B. bavariensis* с типовым штаммом *B. bavariensis* Pbi. Ранее этот штамм и близкородственные ему боррелии относили к OspA серотипу 4 *B. garinii*. Основным переносчиком для *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. afzelii* в Азии являются клещи *I. persulcatus* [Masuzava T. и др., 2004; Margos G. и др., 2013].

### **4.2.1. Разнообразие *B. burgdorferi sensu lato* в Прибайкалье и Монголии**

Для оценки видового разнообразия и генетической вариабельности возбудителей КБ в Прибайкалье и Монголии было использовано четыре хромосомных и плазмидных локуса. Ген 16S rRNA был выбран как наиболее консервативный фрагмент генома, позволяющий с уверенностью установить

вид *B. burgdorferi sensu lato*. Гены p83/100 и OspA кодируют соответствующие мембранные белки, экспонированные на поверхности клеток боррелий. Эти белки являются иммунодоминантными антигенами боррелий, что обуславливает практическую значимость оценки их разнообразия для диагностики КБ. Кроме того, эти белки выполняют важные биологические функции, такие как распознавание и прикрепление к клетке хозяина (прежде всего клещей) [Rössler D. и др., 1995]. Нуклеотидная структура межгенного спейсера 5S-23S rRNA (rrfA-rrlB) в настоящее время является одним из ключевых генетических маркеров при идентификации боррелий, характеристике их внутривидовой структуры, а также при выделении новых видов *B. burgdorferi sensu lato*.

В ходе работ были получены и проанализированы нуклеотидные последовательности 21 изолята *B. burgdorferi sensu lato* из Иркутской области и Монголии (табл. 4-4). Сравнение фрагментов 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 (табл. 4-5). 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. Для сравнения, генетическая дистанция по гену 16S rRNA между *B. burgdorferi sensu lato* и близкородственным видом *B. miyamotoi* из комплекса клещевых возвратных лихорадок составила в среднем  $0,049 \pm 0,001$  нуклеотидных замен на сайт.

Благодаря столь высокой консервативности, анализ последовательностей 16S rRNA позволил идентифицировать вид обнаруженных боррелий, однако не выявил существенных внутривидовых различий *B. burgdorferi sensu lato* даже между популяциями, обитающими в удаленных частях ареала.

**Таблица 4-4.** Характеристика образцов *B. burgdorferi sensu lato* из Иркутской области и Монголии.

Образец	Вид	Форма изолята	Год изоляции	Географическое место изоляции	Исследованные гены	Номер доступа GenBank
1524	<i>B. afzelii</i>	ДНК клеща	2000	Иркутская область	16S rRNA	KP666109
3746	<i>B. afzelii</i>	ДНК клеща	2000	Иркутская область	16S rRNA	KP666111
17B	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2000	Иркутская область	16S rRNA	KP666110
2-9NO	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	ДНК клеща	2001	Иркутская область	16S rRNA	AY182032
7S	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2001	Иркутская область	16S rRNA	KP666112
3342	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2001	Иркутская область	16S rRNA	KP666113
Mng 7-02	<i>B. afzelii</i>	культура	2002	Монголия	МГС* rrfA-rrLB	DQ469910
					OspA	DQ479296
					p83/100	DQ916339
Mng 16-02	<i>B. garinii</i>	культура	2002	Монголия	МГС rrfA-rrLB	DQ469895
					OspA	DQ479282
					p83/100	DQ916323
Mng 36-02	<i>B. afzelii</i>	культура	2002	Монголия	16S rRNA	DQ469888
					МГС rrfA-rrLB	DQ469911
					OspA	DQ479297
					p83/100	DQ916340
Mng 43-02	<i>B. afzelii</i>	культура	2002	Монголия	МГС rrfA-rrLB	DQ469913
					OspA	DQ479298
Mng 47-02	<i>B. garinii</i>	культура	2002	Монголия	МГС rrfA-rrLB	DQ469896
					OspA	DQ479283
					p83/100	DQ916324

\* МГС rrfA-rrLB – нетранслируемый спейсер между генами 5S (rrfA) и 23S (rrlB) рибосомальных РНК.

**Таблица 4-4 (продолжение).** Характеристика образцов *B. burgdorferi sensu lato* из Иркутской области и Монголии.

Образец	Вид	Форма изолята	Год изоляции	Географическое место изоляции	Исследованные гены	Номер доступа GenBank
Mng 67-02	<i>B. afzelii</i>	культура	2002	Монголия	МГС* rrfA-rrLB	DQ469914
					OspA	DQ479302
					p83/100	DQ916341
MNG Ip75-08	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2008	Монголия	16S rRNA	KP666100
MNG Ip90-08	<i>B. bavariensis</i>	ДНК клеща	2008	Монголия	16S rRNA	KP666101
IRK 5-57-10	<i>B. afzelii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666102
IRK 5-81-10	<i>B. afzelii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666103
IRK 5-82-10	<i>B. bavariensis</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666104
IRK 9-5-10	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666105
IRK 9-12-10	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666106
IRK 9-15-10	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666107
IRK 9-16-10	<i>B. garinii</i>	ДНК клеща	2010	Иркутская область	16S rRNA	KP666108

\* МГС rrfA-rrLB – нетранслируемый спейсер между генами 5S (rrfA) и 23S (rrlB) рибосомальных РНК.



**Таблица 4-5.** Генетические дистанции\* между нуклеотидными последовательностями фрагментов генов 16S rRNA *B. burgdorferi sensu lato* из Иркутской области и Монголии и гомологичными последовательностями типовых штаммов разных видов *B. burgdorferi sensu lato*  
Окончание на след. стр

	<i>B. afzelii</i> VS461 NR 104748	<i>B. americana</i> SCW-41 EF570070	<i>B. andersonii</i> 21038 L46701	<i>B. bavariensis</i> Pbi X85199	<i>B. bissettii</i> DN127 NR 114707	<i>B. burgdorferi</i> s.stricto B31 CP009656	<i>B. californiensis</i> CA446 AJ224130	<i>B. chilensis</i> VAI NR 125639	<i>B. garinii</i> 20047 D67018	<i>B. garinii</i> NT29 DQ111064	<i>B. japonica</i> HO14 L46696	<i>B. lusitaniae</i> BR41 X98231	<i>B. sinica</i> CWO1 AB022146	<i>B. spielmani</i> DK35 AM055831	<i>B. tanukii</i> HK501 D67023	<i>B. turdi</i> AC502 D67024	<i>B. valaisiana</i> VS116 X98232	<i>B. miyamotoi</i> HT31 NR 025861
<i>B. afzelii</i> Mng 36-02 DQ469888	<b>0,004</b>	0,025	0,018	0,027	0,022	0,027	0,022	0,022	0,025	0,027	0,018	0,020	0,023	0,016	0,022	0,020	0,020	0,053
<i>B. garinii</i> MNG Ip75-08	0,022	0,016	0,018	0,004	0,009	0,018	0,018	0,018	0,002	<b>0,000</b>	0,018	0,007	0,023	0,016	0,009	0,020	0,020	0,048
<i>B. bavariensis</i> MNG Ip90-08	0,020	0,018	0,020	<b>0,002</b>	0,011	0,020	0,020	0,020	0,004	0,003	0,016	0,009	0,020	0,013	0,011	0,018	0,018	0,050
<i>B. afzelii</i> IRK 5-57-10	<b>0,000</b>	0,020	0,013	0,022	0,018	0,022	0,018	0,022	0,020	0,023	0,013	0,016	0,018	0,011	0,018	0,016	0,016	0,048
<i>B. afzelii</i> IRK 5-81-10	<b>0,000</b>	0,020	0,013	0,022	0,018	0,022	0,018	0,022	0,020	0,023	0,013	0,016	0,018	0,011	0,018	0,016	0,016	0,048
<i>B. bavariensis</i> IRK 5-82-10	0,020	0,018	0,020	<b>0,002</b>	0,011	0,020	0,020	0,020	0,004	0,003	0,016	0,009	0,020	0,013	0,011	0,018	0,018	0,050
<i>B. garinii</i> IRK 9-5-10	0,022	0,016	0,018	0,004	0,009	0,018	0,018	0,018	0,002	<b>0,000</b>	0,018	0,007	0,023	0,016	0,009	0,020	0,020	0,048
<i>B. garinii</i> IRK 9-12-10	0,020	0,013	0,016	0,004	0,007	0,016	0,016	0,016	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,016	0,004	0,020	0,013	0,007	0,018	0,018	0,046
<i>B. garinii</i> IRK 9-15-10	0,022	0,016	0,018	0,004	0,009	0,018	0,018	0,018	0,002	<b>0,000</b>	0,018	0,007	0,023	0,016	0,009	0,020	0,020	0,048
<i>B. garinii</i> IRK 9-16-10	0,022	0,016	0,018	0,004	0,009	0,018	0,018	0,018	0,002	<b>0,000</b>	0,018	0,007	0,023	0,016	0,009	0,020	0,020	0,048

**Таблица 4-5.** Генетические дистанции\* между нуклеотидными последовательностями фрагментов генов 16S rRNA *B. burgdorferi sensu lato* из Иркутской области и Монголии и гомологичными последовательностями типовых штаммов разных видов *B. burgdorferi sensu lato* (окончание)

	<i>B. afzelii</i> VS461 NR 104748	<i>B. americana</i> SCW-41 EF570070	<i>B. andersonii</i> 21038 L46701	<i>B. bavariensis</i> Pbi X85199	<i>B. bissettii</i> DN127 NR 114707	<i>B. burgdorferi</i> s.stricto B31 CP009656	<i>B. californiensis</i> CA446 AJ224130	<i>B. chilensis</i> VA1 NR 125639	<i>B. garinii</i> 20047 D67018	<i>B. garinii</i> NT29 DQ111064	<i>B. japonica</i> HO14 L46696	<i>B. lusitanae</i> BR41 X98231	<i>B. sinica</i> CWO1 AB022146	<i>B. spielmani</i> DK35 AM055831	<i>B. tanukii</i> HK501 D67023	<i>B. turdi</i> AC502 D67024	<i>B. valaisiana</i> VS116 X98232	<i>B. miyamotoi</i> HT31 NR 025861
<i>B. burgdorferi</i> 2-9NO AY182032	0,016	0,023	0,016	0,025	0,016	0,025	0,016	0,025	0,018	0,02	0,025	<b>0,013</b>	0,025	0,023	0,020	0,027	0,027	0,046
<i>B. afzelii</i> IRK 1524	<b>0,003</b>	0,021	0,012	0,021	0,018	0,021	0,015	ND**	0,021	0,021	0,009	0,015	0,018	0,012	0,024	0,018	0,018	0,056
<i>B. garinii</i> IRK 17B	0,027	0,024	0,028	0,012	0,015	0,024	0,024	ND	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	0,021	0,012	0,027	0,021	0,015	0,028	0,027	0,052
<i>B. afzelii</i> IRK 3746	<b>0,012</b>	0,024	0,021	0,024	0,021	0,024	0,024	ND	0,024	0,024	0,018	0,024	0,015	0,021	0,034	0,015	0,021	0,046
<i>B. garinii</i> IRK 7S	0,018	0,018	0,015	0,012	0,015	0,018	0,018	ND	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	0,018	0,012	0,021	0,015	0,015	0,021	0,021	0,046
<i>B. garinii</i> IRK 3342	0,024	0,018	0,021	0,006	0,009	0,018	0,018	ND	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,018	0,006	0,021	0,015	0,009	0,021	0,021	0,046

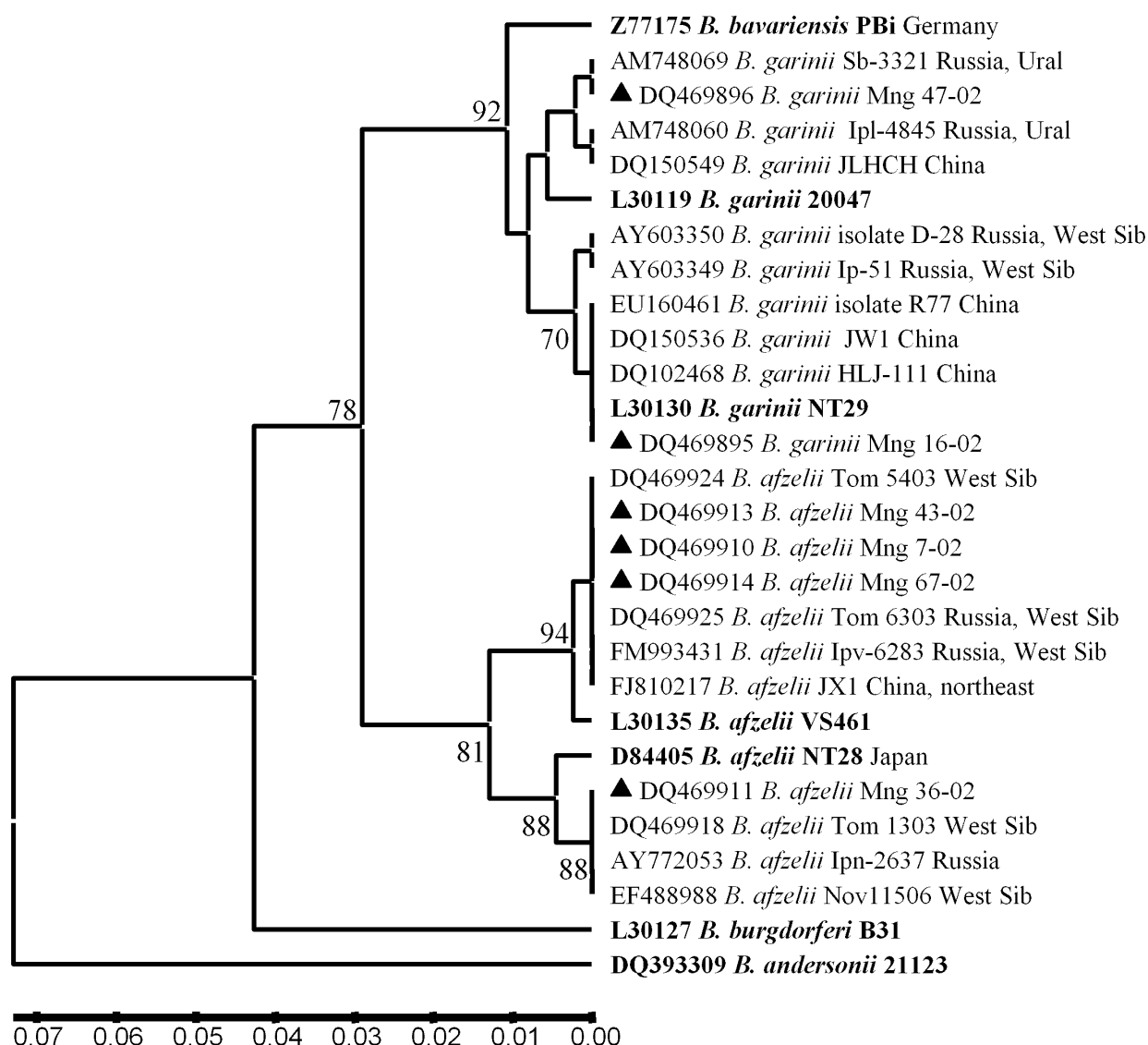
\* генетические дистанции рассчитывали попарно как количество нуклеотидных замен на сайт. Наименьшие дистанции для каждого изолята выделены жирным шрифтом и означают наибольшее генетическое сходство. Наиболее соответствующую эволюционную модель выбирали с помощью метода Maximum Likelihood. Анализ проводили с использованием трехпараметрической модели Тамуры [Tamura K., 1992], итоговый набор данных включал 28 нуклеотидных последовательностей длиной 455 н.о., кодирующий позиции 42-496 гена 16S rRNA (согласно нумерации *B. afzelii* VS461 NR 104748). Расчеты производили в программе Mega 6 [Tamura K., 2013].

\*\* ND – значение не определено из-за отсутствия гомологичной последовательности для типового штамма.

Далее для оценки внутривидового полиморфизма *B. burgdorferi sensu lato*, мы выбрали несколько изолятов *B. garinii* и *B. afzelii*, выделенных на крайней южной границе обитания этих видов боррелий в Монголии и проанализировали структуру их генов поверхностных белков OspA, р83/100 и межгенного спейсера 5S-23S rRNA.

#### **4.2.2. Внутривидовой полиморфизм *B. garinii* и *B. afzelii* на основе анализа структуры межгенного спейсера 5S-23S rRNA**

Анализ последовательностей межгенного спейсера подтвердил, что исследуемые изоляты боррелий представлены двумя видами комплекса *B. burgdorferi s.l.* - *B. garinii* и *B. afzelii* (рис. 4-5, табл. 4-4). 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. 4-4). 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 [He J. и др., 2005 (опубл. только в GenBank); Нефедова В.В. и др., 2010]. 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. 4-5).



**Рисунок 4-5. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основании нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 5S-23S rRNA *B. burgdorferi* s.l. с использованием метода UPGMA. Отображены послетовальности типовых штаммов (выделены жирным шрифтом) и наиболее близкородственные последовательности согласно поиску BLAST. Изоляты из Монголии обозначены черными треугольниками. Достоверность реконструкции устанавливали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 повторов, значения поддержки выше 70% отображены рядом с соответствующими узлами дендрограммы. Шкала генетических дистанций эквивалентна 0,01 нуклеотидной замене на сайт и приведена внизу. Анализ выполняли с помощью пакета программ MEGA 6.**

При сравнении нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера изолятов *B. afzelii* Mng 3602, Tom 1103 и Tom 2504 с ранее опубликованными установлено, что они соответствуют, с уровнем гомологии 99 %, последовательности *B. afzelii* штамма NT28 (D84405) изолированного в Японии.

При этом, наиболее эволюционно близкими оказались изоляты из западной Сибири *B. afzelii* Tom 1303 и *B. afzelii* Nov11506. Изоляты *B. afzelii* Mng 7-02, Mng 16-02, Mng 43-02 и Mng 67-02 коластеризовались вместе с типовым штаммом *B. afzelii* Vs461, а нуклеотидная последовательность их 5S-23S rRNA спейсера была идентична изолятам из Западной Сибири и Китая (рис. 4-5).

Анализа полиморфизма 5S-23S rRNA спейсера *B. garinii* и *B. afzelii* показал, что для обоих видов характерно формирование сложной внутривидовой структуры. Выборка из 384 последовательностей *B. afzelii* формировала 4 эволюционных линии, включающие 8 кластеров. Большинство выделяемых кластеров содержат как азиатские, так и европейские изоляты от разных видов хозяев, однако четыре из восьми кластеров *B. afzelii* состояли исключительно из европейских изолятов, при этом исключительно азиатских кластеров обнаружено не было.

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 %. Возможно, это свидетельствует о недостаточной разрешающей способности реконструкций на основе исследуемого фрагмента, что затрудняет выявление ассоциаций эволюционных линий *B. garinii* и *B. afzelii* с экологическими или географическими особенностями их обитания. Наши данные совпадают с результатами анализа других авторов, которые также указывают на наличие сложной внутривидовой структуры *B. garinii*. Так, например, В.В. Нефедовой с соавторами [2010] было выделено 16 геновариантов *B. garinii*, из которых геноварианты 1, 2 и 3 относятся к группе NT29, а геноварианты 4-16 - к группе 20047. Они отмечают ассоциацию определенных геновариантов с ареалом

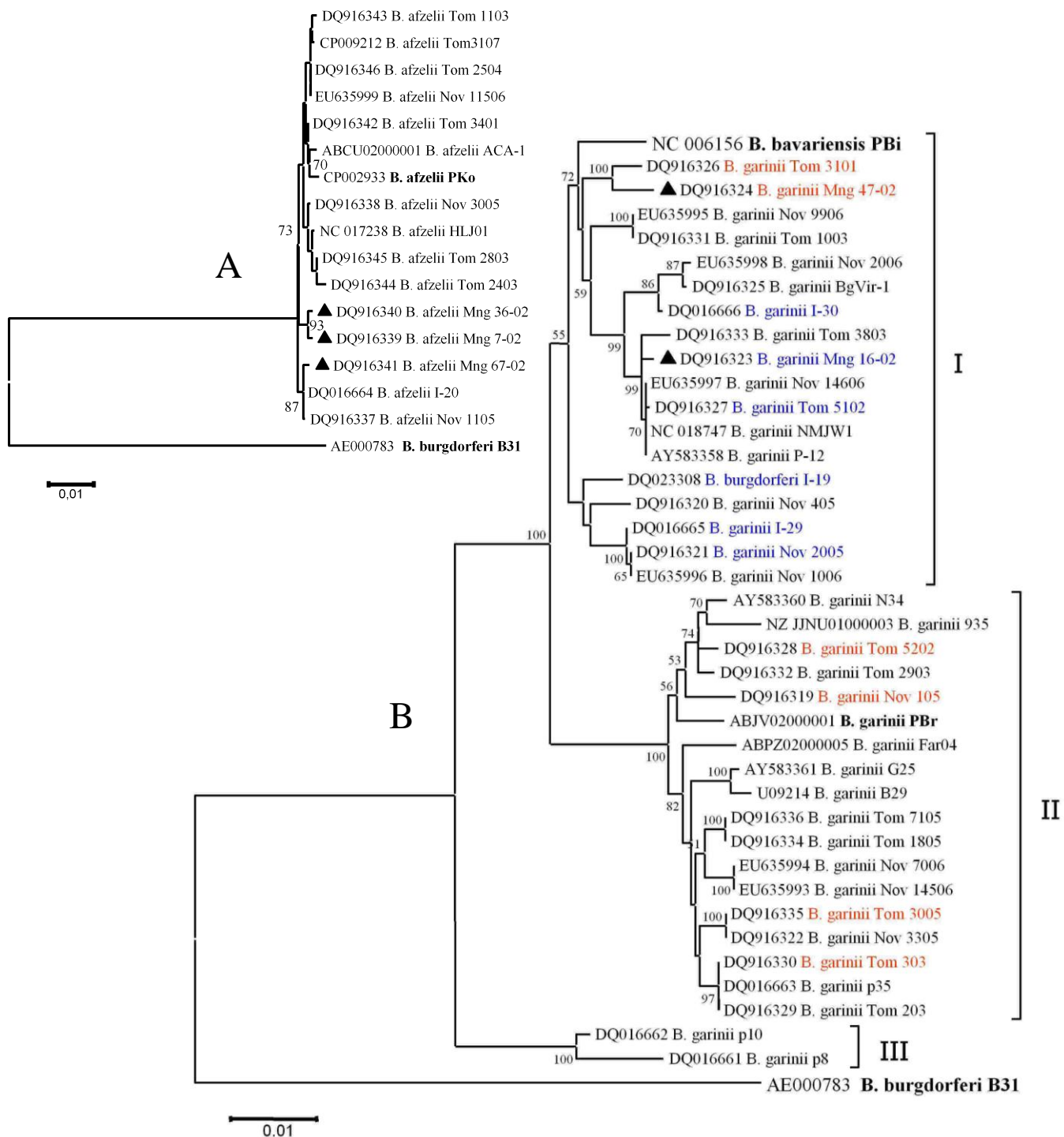
клещей переносчиков *I. persulcatus* (1) или *I. ricinus* (5), привязкой к определенным географическим границам в пределах азиатской (3, 4, 8, 16), восточноевропейской-азиатской (7, 12, 14, 15) или дальневосточной (6) частей ареала *B. garinii*. Пять геновариантов (2, 9, 10, 11, 13) распространены повсеместно и не проявляют очевидных ассоциаций ни с географическим местом изоляции ни с какими-либо другим экологическими факторами. Так же, как и в настоящем исследовании, авторами не было обнаружено взаимосвязи между геновариантом боррелий и видом хозяина [Нефедова В. В. и др., 2010].

#### **4.2.3. Внутривидовой полиморфизм *B. garinii* и *B. afzelii* на основе анализа структуры гена p83/100**

Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена p83/100 с 12 ранее известными последовательностями, подтвердило, что 5'- и 3' – концевые участки гена являются консервативными для представителей комплекса *B. burgdorferi s.l.*, а центральная часть между аминокислотными позициями 390 - 540 высоковариабельна и характеризуется не только большим числом нуклеотидных замен, но и наличием инсерций и делеций [Rössler D. и др., 1995]. Для всех нуклеотидных последовательностей гена p83/100, относимых к *B. afzelii*, определена крупная делеция в позиции 1272-1361 п.н., показанная ранее для последовательности гена p83/100 вида *B. afzelii* [Jauris-Heipke S. и др., 1993]. Сравнение всех известных к настоящему времени последовательностей гена p83/100 показало варьирование степени гомологии гена от 82,9 до 100 % для видов *B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii* и *B. garinii*. Ранее было показано, что степень гомологии гена p83/100 разных видов комплекса *B. burgdorferi s.l.* превышает 88 % [Rössler D. и др., 1995]. Степень сходства нуклеотидных последовательностей между изолятами внутри одного вида составила 95,6 - 99,7% для вида *B. burgdorferi s.s.*, 99,0 – 100 % для вида *B. afzelii* и 92,9 – 100 % для вида *B. garinii*. Тогда как межвидовое сходство по гену p83/100 составило 82,9 - 90,6 %, что значительно ниже, чем степень гомологии внутри наиболее гетерогенного по данному гену вида *B. garinii*.

Филогенетический анализ, проведенный с использованием нуклеотидных последовательностей гена р83/100, подтвердил, что в соответствии с определенными ранее степенями сходства все исследованные последовательности разбиваются на шесть отдельных кластеров, которые соответствуют видам комплекса *B. burgdorferi* s.l.: *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. bissettii*, *B. valaisiana* и *B. spielmani*. Изолят *B. bavariensis* Pbi кластеризовался вместе с изолятами *B. garinii*, при этом генетическая дистанция между *B. bavariensis* Pbi и *B. garinii* была существенно меньше, чем дистанции между *B. bavariensis* Pbi и другими видами *B. burgdorferi* s.l., например, близкородственным видом *B. valaisiana* (рис. 4-5). Монгольские изоляты кластеризовались с *B. garinii* и *B. afzelii* в соответствии с видовой принадлежностью, установленной на основе анализа гена 16S rRNA и межгенного спейсера (см. разд. 4.2.1 и 4.2.2).

В отличие от структуры межгенного спейсера 5S-23S rRNA, по структуре гена р83/100 выделяется всего 3 кластера *B. garinii*, при этом не наблюдается существенной взаимосвязи между кластеризацией изолятов и такими их экологическими характеристиками как источник изоляции (вид хозяина) или географическое место изоляции (рис. 4-6).



**Рисунок 4-6. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основании полных нуклеотидных последовательностей гена *p83/100* *B. afzelii* (A) и *B. garinii* (B) с использованием метода Maximum Likelihood. Изоляты из Монголии обозначены черными треугольниками. Красным шрифтом выделены изоляты *B. garinii*, по структуре межгенного спейсера *rrfA-rrlB* относящиеся к геногруппе 20047, синим – относящиеся к геногруппе NT29. Жирным шрифтом выделены типовые штаммы соответствующих видов *B. burgdorferi sensu lato*. Достоверность реконструкции устанавливали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 повторов, значения поддержки выше 70 % отображены рядом с соответствующими узлами дендрограммы. Шкала генетической дистанции эквивалентна 0,01 нуклеотидной замене на сайт и приведена внизу. Анализ выполняли с помощью пакета программ MEGA 6.**



В кластер I вошли все анализируемые нами последовательности *B. garinii* подгруппы NT29, последовательности изоляты *B. garinii* Tom 31-01 и Mng 47-02 относящиеся к группе 20047, а также изоляты *B. bavariensis* Pbi и Trob. Кластер II представлен 18 изолятами из которых 14 относятся к *B. garinii* группы 20047, а для остальных групповая принадлежность не определена. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей Pbi, Tom 31-01 и Mng 47-02 показал, что сходство между ними и последовательностями II субкластера составила 93,2 - 97,6 %, тогда как с последовательностями I субкластера 94,8 - 98,8%. Степень сходства нуклеотидных последовательностей между изолятами внутри II и I субкластеров составляет 94,1 – 100 % и 98,2 – 100 %, соответственно, а при сравнении между собой последовательностей этих двух субкластеров – 92,9-97,8 %. Таким образом, степень сходства последовательностей Pbi, Tom 31-01 и Mng 47-02 с последовательностями I субкластера ниже, чем с последовательностями II субкластера и приближается по своим значениям к степени сходства между последовательностями I и II субкластеров. Полученные результаты, также подтверждают близость последовательностей гена р83/100 Pbi, Tom 31-01 и Mng 47-02 к последовательностям *B. garinii* подгруппы NT29, о чем свидетельствует и филогенетический анализ. Изолят Tom 10-03 с нетипичной структурой межгенного спейсера также вошел в I субкластер и филогенетически близок изолятам *B. garinii* подгруппы NT29. Кластер III сформирован двумя своеобразными западносибирскими изолятами р8 и р10, изолированными в Омской области от клещей *I. persulcatus*.

Таким образом, анализ гена р83/100 указывает на то, что 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* еще не полностью охарактеризовано.

Кластер, образованный боррелиями вида *B. afzelii*, не столь гетерогенен, как кластер вида *B. garinii*, что соответствует ранее полученным данным об внутривидовой однородности *B. afzelii* на примере других генов [Will G. и др., 1995]. Несмотря на отличия в последовательности межгенного спейсера 5S-23S рРНК, по структуре гена р83/100 изоляты *B. afzelii* Mng 36-02, Tom 11-03 и Tom 25-04 имеют высокую степень сходства (99 %) с остальными последовательностями вида *B. afzelii*. Это согласуется с более высокой степенью сходства последовательности гена р83/100 вида *B. afzelii*.

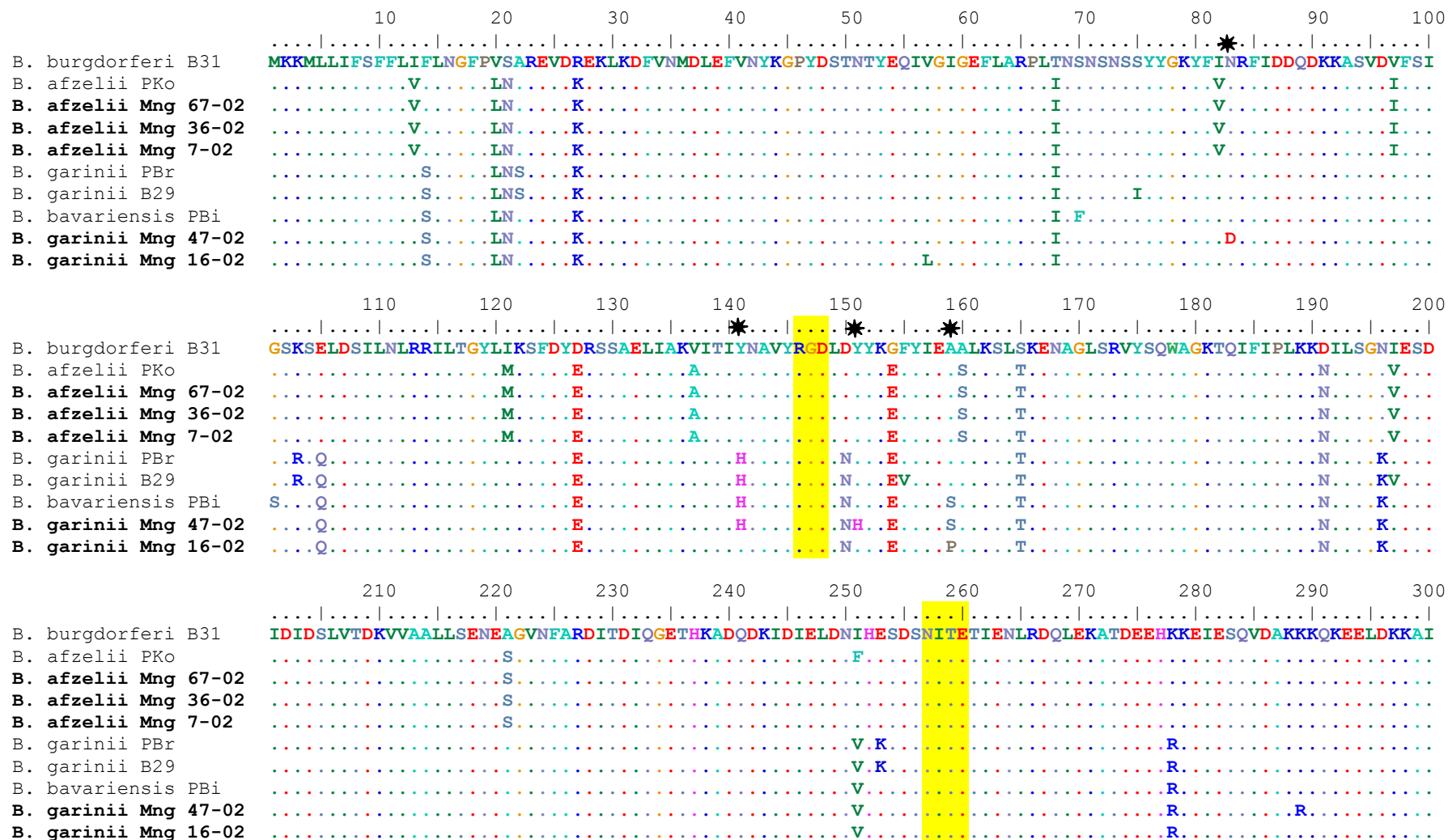
Сравнительный анализ транслированных аминокислотных последовательностей монгольских изолятов с последовательностями типовых штаммов показал наличие консервативного RGD148-сайта в позиции 146-148 а.о. и двух гипотетических сайтов гликозилирования - NITE260 и NSSL627 - в позициях 257-260 а.о. и 624-627 а.о. соответственно. Наличие RGD-сайта, локализованного в консервативной области и присутствующего во всех построенных последовательностях белка, позволяет предположить функциональную важность этого сайта. Поскольку RGD-сайт является лигандом для интегрина, предполагается участие белка Р83/100 в механизмах связывания через адгезию [Rössler D и др., 1995]. Ранее было показано, что определяемые белки Р83, Р93, Р97, Р100 кодируются геном р83/100, хотя молекулярные массы этих белков различаются мало и равняются в среднем 79,8 кДа [Perng G.C. и др., 1991; Rössler D. и др., 1995]. Незначительные отклонения могут быть обусловлены образованием разветвленных углеводородных цепей при возможном гликозилировании.

В настоящее время установлено, что белок Р83/100 является мембранно ассоциированным белком, и антитела к этому белку выявляются у больных с самой ранней стадии диссеминации. Показано, что антигенные детерминанты локализованы в центральном гидрофильном районе белка между аминокислотными позициями 390-540. Одним из ключевых эпитопов для

антител является пептид (IKESLEDLQEQLKET) локализованный в позициях 357-371 [Luft B.J. и др., 1992; Nowalk A.J. и др., 2006; Anda P. и др., 1994]. У анализируемых изолятов боррелий из Монголии С-конец белка P83/100 является высоковариабельным, при этом наиболее гетерогенный район локализован в пределах позиций 250-550 и составляет приблизительно 300 а.о. (рис. 4-7). Структура пептида (IKESLEDLQEQLKET) была полностью консервативной, за исключением специфичной для *B. afzelii* замены Т/А в позиции 371. Это позволяет предположить, что данный пептид имеет важное функциональное значение и при этом не экспонирован на поверхности клетки, за счет чего изолирован от воздействия антител хозяина.

Сравнение аминокислотной структуры белка p83/100 типовых штаммов и определенных в данной работе последовательностей показал, что монгольские изоляты содержат 15 мутаций, приводящих к изменению класса аминокислоты. Из них 9 локализованы в центральном гидрофильном регионе, 5 – в аминоконцевой части белка и одна – в карбокси-конце (рис. 4-7). Мутации в аминоконцевых частях p83/100 были характерны только для *B. garinii*, аминокислотная структура *B. afzelii* в этих локусах полностью соответствовала структуре референс-штамма *B. afzelii* РКо (рис. 4-6). Исключением стала консервативная замена фенилаланина на изолейцин в позиции 251, а также 2 консервативные замены валина на аланин и лейцина на фенилаланин в позициях 637 и 686 соответственно. Мутация в позиции 251 была у всех монгольских изолятов и также была характерна для типового штамма *B. burgdorferi sensu stricto* B31, однако не встречалась ни у *B. afzelii* РКо, ни у *B. garinii*, ни у *B. bavariensis*. Мутация в полиморфной позиции 637 была характерна для изолята *B. afzelii* Mng67-02, *B. garinii* 47-02 и для *B. bavariensis*, в то время как мутация в позиции 686 встречалась только у *B. afzelii* РКо, среди остальных изолятов эта аминокислота была консервативной.

Обилие неконсервативных аминокислотных замен в гидрофильном регионе позволяет предположить, что существуют внутривидовые отличия иммунологических свойств данного белка в разных частях ареала, и,



**Рисунок 4-7. Транслированные аминокислотные последовательности белка p83/100 *B. burgdorferi sensu lato*.** Названия изолятов из Монголии выделены жирным шрифтом. Интегрин связывающий домен RGD, сайты гликозилирования и гипервариабельный гидрофильный регион 390-550 затенены желтым цветом. Линейный консервативный эпитоп 357-371 (IKESLEDLQEQLKET) подчеркнут черной линией. Позиции, в которых у монгольских изолятов обнаружены мутации, приводящие к изменению класса аминокислоты, обозначены черными звездочками.

		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
B. burgdorferi B31		.....*	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. afzelii PKo		D.....F.....I..D.....L..N...T.....						AS.....		N..E..F..N..H..	
B. afzelii Mng 67-02		D.....F.....I..D.....L..N...T.....						AS.....		N..E...N..H..	
B. afzelii Mng 36-02		D.....F.....I..D.....L..N...T.....						AS.....		N..E...N..H..	
B. afzelii Mng 7-02		D.....F.....I..D.....L..N...T.....						AS.....		N..E...N..H..	
B. garinii PBr		DI.....S.....I..D.....						S.....		KE..N..P..	
B. garinii B29		D.....S.....I..D.....D.....						S.....		E.....P..	
B. bavariensis PBi		D.....FS.....I..D.....						S.....		E.....P..	
B. garinii Mng 47-02		D.....FS.....I..D.....						S.....		E.....P..	
B. garinii Mng 16-02		D.....FS..H..I..D.....						S.....		E.....P..	
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
B. burgdorferi B31		.....*	.....	.....	.....	.....	.....	.....*	.....*	.....*	.....*
B. afzelii PKo		ASKDGKALDLDRELNSKASSKEKSKAKEEEITKGSQKSLGDLNNDENLMPEDQKLPEVKKLDSKKEFKPVSEVEKLDKIFKSNNN-VGELSPLDKSSY						E.....NLE.....AD.V...S.....E.SK.....EP..			
B. afzelii Mng 67-02		.....KQ.....IEGE..D-----						E.....KLE.....AD.V...S.....E.SK.....P..			
B. afzelii Mng 36-02		.....KQ.....IEGE..D-----						E.....KLE.....AD.V...S.....E.SK.....P..			
B. afzelii Mng 7-02		.....KQ.....IEGE..D-----						E.....KLE.....AD.V...S.....E.SK.....P..			
B. garinii PBr		.....N.D...V.....I.G..G..V.EE KA..A.....R-----S.D.....KL.S...IKRVNE.S...E.S.S...P..						NL.....I.RVNE.S...EIS.S...Y.P..			
B. garinii B29		.....NGD...V.....I.G..G..V.EE KA..A.....R-----S.D.....NL.....I.RVNE.S...EIS.S...Y.P..						NL.....I.RVNE.S...E.SKS...P..			
B. bavariensis PBi		.....N.D...V.....I.G..K..V.EE KV...D...T..T.....S.D.....NL.....I.RVNE.S...E.SKS...P..						NL.....I.RVNE.S...E.SKS...P..			
B. garinii Mng 47-02		.....N.N...V.....N.G..K..V.EE KV...T.....S.D.....NL.....I.RVNE.S...E.SKS...P..						NL.....I.RVNE.L...E.SKS...P..			
B. garinii Mng 16-02		.....N.D...V.....N.G..K..VNEE KL...P.T.....S.D.....NL.....I.RVNE.L...E.SKS...P..									
		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
B. burgdorferi B31		*.....*	.....	.....*	.....*	.....*	.....	.....	.....	.....	.....
B. afzelii PKo		KDIDSKEETVKNKDVNLQKTKPQVKDQVTSLNEDLTTMSIDSSSPVFLEVIDPITNLGTLQLIDLNTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKDLVVIKMDSGKA						A.....		I.....	
B. afzelii Mng 67-02		S.....GVD...D.....ES.P.....IDV...N.....						A.....		I.....	
B. afzelii Mng 36-02		S.....GVD...D.....ES.P.....IDV...N.....						A.....		I.....	
B. afzelii Mng 7-02		R.....GVD...D.....ES.P.L.....DV.V..NN.....						A.....		I.....	
B. garinii PBr		R.M....GID.....E.....T.S.P...Q.....N.....						V.....			
B. garinii B29		S.M....GID.....E.....S.T.S.P...Q.....N.....									
B. bavariensis PBi		S.....VVD...D.....E.....A.S.S...Q..I.....N.....					M.....				
B. garinii Mng 47-02		S.....Q.GVD...D.....E.....A.S.P.F..Q.....N.....									
B. garinii Mng 16-02		S.....VVD...D.....E.....A.S.P...Q.....N.....									

Рисунок 4-7. Продолжение

		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
B. burgdorferi B31		KLQILDKLENLKVVSESNFEINKSSLYVDSKMLVAVRDKDSSNDWRLAKFSPKNLDEFILSENKIMPFTSFSVRKNFIYLODEFKSLVILDVNTLKKV							*		
B. afzelii PKo		.....I.....R.....V.--.D..A.....L.....A.....L.....T.....									
B. afzelii Mng 67-02		.....I.....R.....V.--.D..A.....L.....A.....T.....									
B. afzelii Mng 36-02		.....I.....R.....V.--.D..A.....L.....A.....T.....									
B. afzelii Mng 7-02		.....I.....R.....V.--.D..A.....L.....A.....T.....									
B. garinii PBr		.....N.....I.....V.--.G..V.....L.....IT..L.....									
B. garinii B29		.....N.....I.....G.--.G..V.....N.....L.....IT..L.....									
B. bavariensis PBi		.....N.....I.....--.G..V.....L.....IT..L.....									
B. garinii Mng 47-02		.....N.....I.....--.G..V.....L.....D.....IT..L.....									
B. garinii Mng 16-02		.....N.....I.....V.--.G..V.....L.....IT..L.....									
B. burgdorferi B31	.										
B. afzelii PKo	.										
B. afzelii Mng 67-02	.										
B. afzelii Mng 36-02	.										
B. afzelii Mng 7-02	.										
B. garinii PBr	E										
B. garinii B29	.										
B. bavariensis PBi	E										
B. garinii Mng 47-02	E										
B. garinii Mng 16-02	E										

Рисунок 4-7. Окончание.

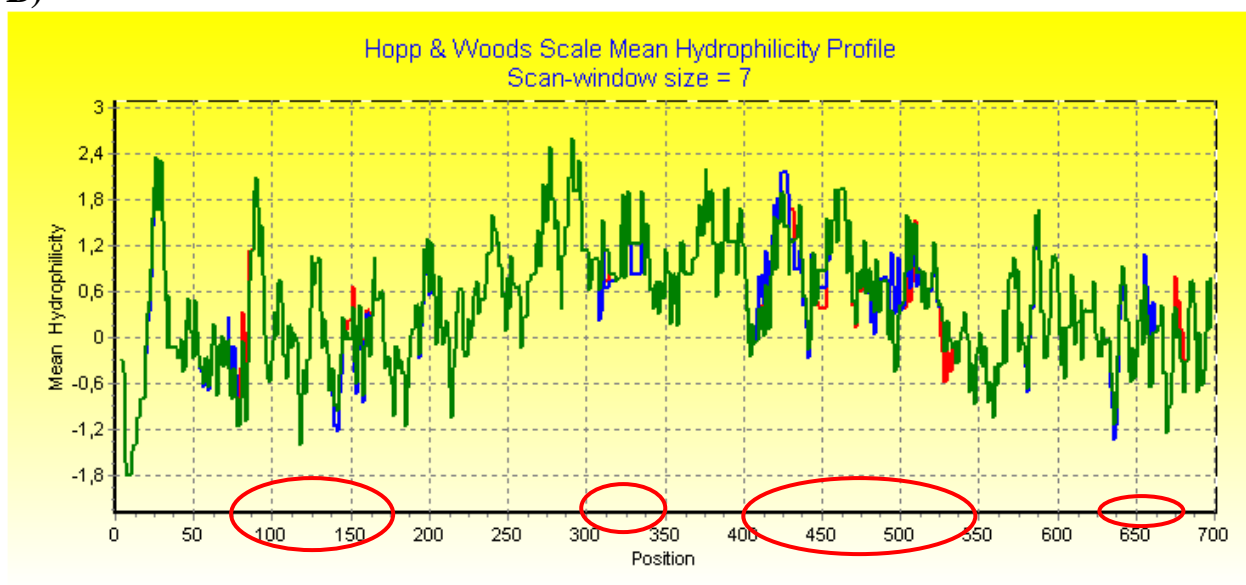
следовательно, этот домен белка р83/100 играет существенную роль при адаптации *B. burgdorferi sensu lato* к организму хозяина.

При сравнении среднего профиля гидрофильности монгольских изолятов с профилем типовых штаммов по методу Hopp and Woods, в белке р83/100 *B. garinii* выявляется 4 переменных региона, локализованных в позициях 75-175, 300-350, 400-550 и 625-675 а.о. (рис. 4-8). В этих регионах наблюдаются существенные флуктуации показателя гидрофильности белка р83/100, что указывает на изменение степени экспонированности соответствующих позиций на поверхности белка р83/100. Это может свидетельствовать об изменениях в расположенных в данных локусах антигенных детерминантах [Hopp T.P. and Woods K.R., 1981]. Изоляты *B. afzelii* обладали более консервативной структурой – у них существенные изменения гидрофильности отмечены только в регионе 400-500 а.о. Ранее D. Rössler с соавт. были проведены исследования 10 полных нуклеотидных последовательностей гена р83/100 изолятов полученных в Европе и 1 – в США. Авторами показаны отличия в реагировании моноклональных антител, полученных к рекомбинантным белкам Р83/100, с лизатами клеток боррелий штаммов разных видов [Rössler D. и др., 1995]. С учетом полученных нами данных можно предполагать, что структура и иммунологические свойства Р83/100 варьируют не только в пределах комплекса *B. burgdorferi sensu lato*, но и внутри видов *B. garinii* и *B. afzelii*.

A)



B)



**Рисунок 4-8. Сравнение профилей гидрофильности внутри видов *B. afzelii* и *B. garinii*** по шкале Хорп и Вудс [Hopp T.P. and Woods K.R., 1981] со скользящим окном 7 а.о. (А) Показатели гидрофильности изолята *B. afzelii* PKo (GenBank accession № NZ\_ABCU02000001) отображены коричневой линией, изоляты *B. afzelii* Mng7-02, Mng36-02 и Mng67-02 отображены красной, синей и зеленой линией соответственно; (В) Показатели гидрофильности изолята *B. garinii* B29 (GenBank accession № U09214) отображены зеленой линией, изоляты *B. garinii* Mng16-02 и Mng47-02 отображены красной и синей линией соответственно. Регионы с наибольшим количеством изменений отмечены красным овалом на шкале аминокислотных позиций (абсцисс).



Мы исследовали структуру гена p83/100 боррелий, изолированных из клещей *I. persulcatus*, широко распространенных на территории России и поддерживающих циркуляцию боррелий *B. garinii* подгруппы NT29 [Masuzawa T., 2004]. Значительное увеличение числа проанализированных штаммов и изолятов позволило выявить формирование своеобразной внутривидовой структуры *B. garinii* и подтвердило ранее рассматривавшуюся возможность определения видовой принадлежности для видов *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. burgdorferi* s. s. по последовательности гена p83/100 [Rössler D. и др., 1995].

В целом, результаты сравнительного и филогенетического анализов подтвердили возможность использования последовательности гена p83/100 для определения видовой принадлежности представителей трех патогенных видов комплекса *B. burgdorferi* s.l. Анализ последовательностей вида *B. garinii* подтвердил большую гетерогенность и выделение групп внутри вида *B. garinii*, однако полного соответствия с группами вида, выделяемыми при ПДРФ-анализе межгенного спейсера 5S-23S рРНК, показано не было. Для последовательностей вида *B. afzelii* отмечена высокая степень гомологии. Однако экологические причины формирования наблюдаемого разнообразия не очевидны. Так, каждая обнаруженная по структуре гена p83/100 внутривидовая группа содержит изоляты, полученные от клещей и больных людей в географически удаленных частях ареала *B. burgdorferi* s.l. без существенной взаимосвязи между филогенетической кластеризацией, видовой принадлежностью хозяина или географическим местом изоляции.

С практической точки зрения, наблюдаемый внутривидовой полиморфизм в гидрофильном участке p83/100 говорит о том, что при использовании этого белка в диагностических целях необходимо учитывать возможные отличия иммунореактивных свойств у *B. garinii* и *B. afzelii* в разных частях ареала.

#### 4.2.4. Внутривидовой полиморфизм *B. garinii* и *B. afzelii* на основе анализа структуры гена OspA

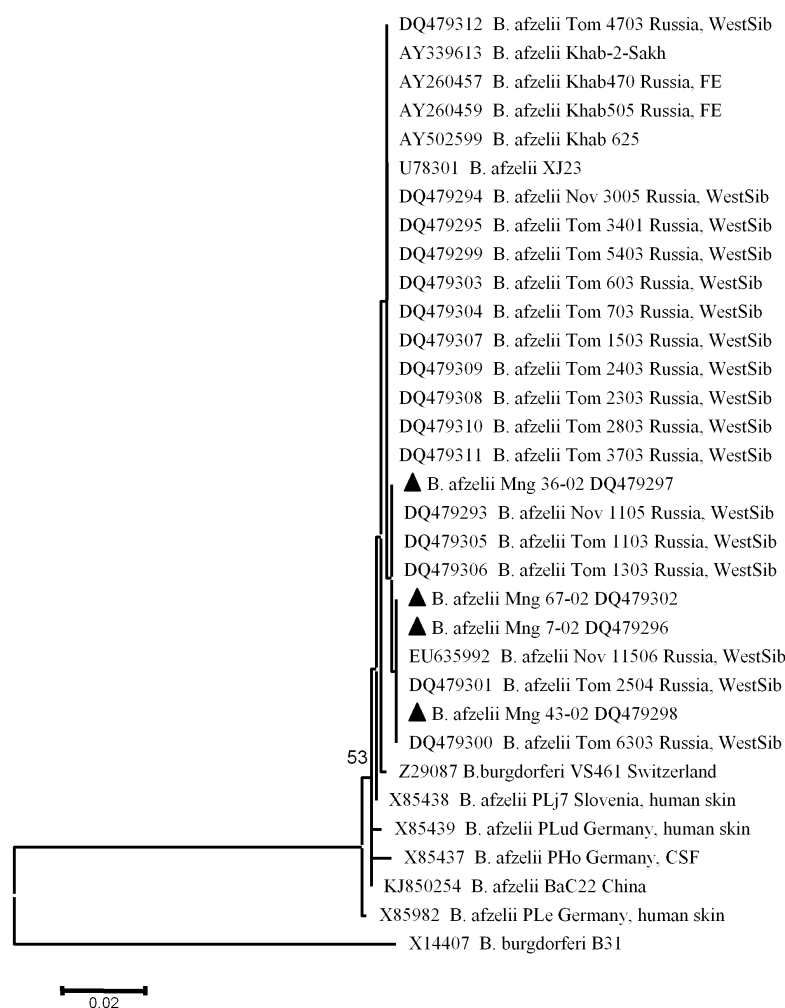
Поверхностный липопротеин OspA экспрессируется во время циркуляции *B. burgdorferi sensu lato* в организме клеща, обеспечивает прикрепление к клеткам кишечника клеща и критически необходим для трансмиссии боррелий между зараженными и незараженными клещами [Yang X.F. и др., 2004]. Ранее отмечена существенная гетерогенность боррелий по структуре этого антигена, ассоциированная с географическим местом и/или источником изоляции бактерий. Так, в Европе и Северной Америке было выделено 7 серотипов OspA, серотип 1 включал в себя *B. burgdorferi sensu stricto*, 2 – *B. afzelii* а серотипы 3 – 7 были отнесены к *B. garinii* [Wilske B. и др., 1993]. Впоследствии боррелии OspA серотипа 4 были выделены в новый вид *B. bavariensis* [Margos G. и др., 2009]. При исследовании разнообразия *B. burgdorferi sensu lato* на Дальнем Востоке, было описано 11 серотипов OspA J1-J11, из которых лишь один – J10 – соответствовал ранее описанному серотипу 2 *B. afzelii*. Серотипы J1 – J9 представляли собой локальные варианты *B. garinii*, которые существенно отличались как от европейских, так и от североамериканских вариантов *B. burgdorferi sensu lato* [Masuzawa T. и др., 1996]. На Дальнем Востоке России также отмечается существенный полиморфизм *B. garinii*, на основе анализа 30 изолятов выделено 3 основных геногруппы. Геногруппы 1 «Extremiorientalis» и 2 «Intermediate» объединяли *B. burgdorferi sensu lato*, изолированные на Дальнем Востоке и в Японии. Геногруппа 3 «European» включала европейские изоляты боррелий, относящиеся к серотипам 3 - 7 [Mediannikov O.Y. и др., 2005].

В данной работе проанализирована структура гена OspA 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. Длина полноразмерного гена OspA составила 819 н.о. для 5 изолятов, изолят *B.*

*garinii* Mng47-02 имел длину гена 816 н.о. засчет делеции 1 кодона в позициях 457-459. Данная делеция была также характерна для дальневосточных изолятов *B. garinii* из группы JEM1 [Wang J. и др., 1997]. Степень сходства генов OspA монгольских *B. afzelii* составляла 99,9 – 100 %, в то время как последовательности *B. garinii* проявляли 93,5 % сходства по нуклеотидной последовательности. Поиск ближайших гомологов для монгольских *B. afzelii* с помощью сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) показал их идентичность (100% сходства) последовательностям изолятов *B. afzelii* Nov1105, Nov1106, Tom1103, Tom1303, Tom2504, Tom3107 и Tom6303, полученными от таежных клещей в Новосибирской и Томской областях РФ. Для *B. garinii* была выявлена наибольшая (99 %) идентичность с последовательностями *B. garinii* Khab550 и *B. garinii* Khab466, изолированными в Хабаровском крае от таежных клещей. [Mediannikov O.Y. и др., 2005].

Реконструкция филогенетических взаимоотношений *B. burgdorferi sensu lato*, обитающих в Монголии показала, что *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% (рис. 4-9). Таким образом, можно предположить, что на всем протяжении ареала от Японии до Западной Европы обитают *B. afzelii* с практически идентичной структурой белка OspA. Это может быть объяснено наличием крайне эффективного механизма миграции *B. afzelii* в пределах Евразии. Однако, ранее полученные данные о наличии внутривидового полиморфизма *B. afzelii* по структуре гена p83/100 и межгенного спейсера *rrfA-rrlB* свидетельствуют против подобного вывода. Нам представляются наиболее реалистичными два механизма поддержания униформности гена OspA. Во-первых, возможно, что механизм горизонтального переноса линейной плазмиды lp54, в которой локализован ген *OpsA*, чрезвычайно

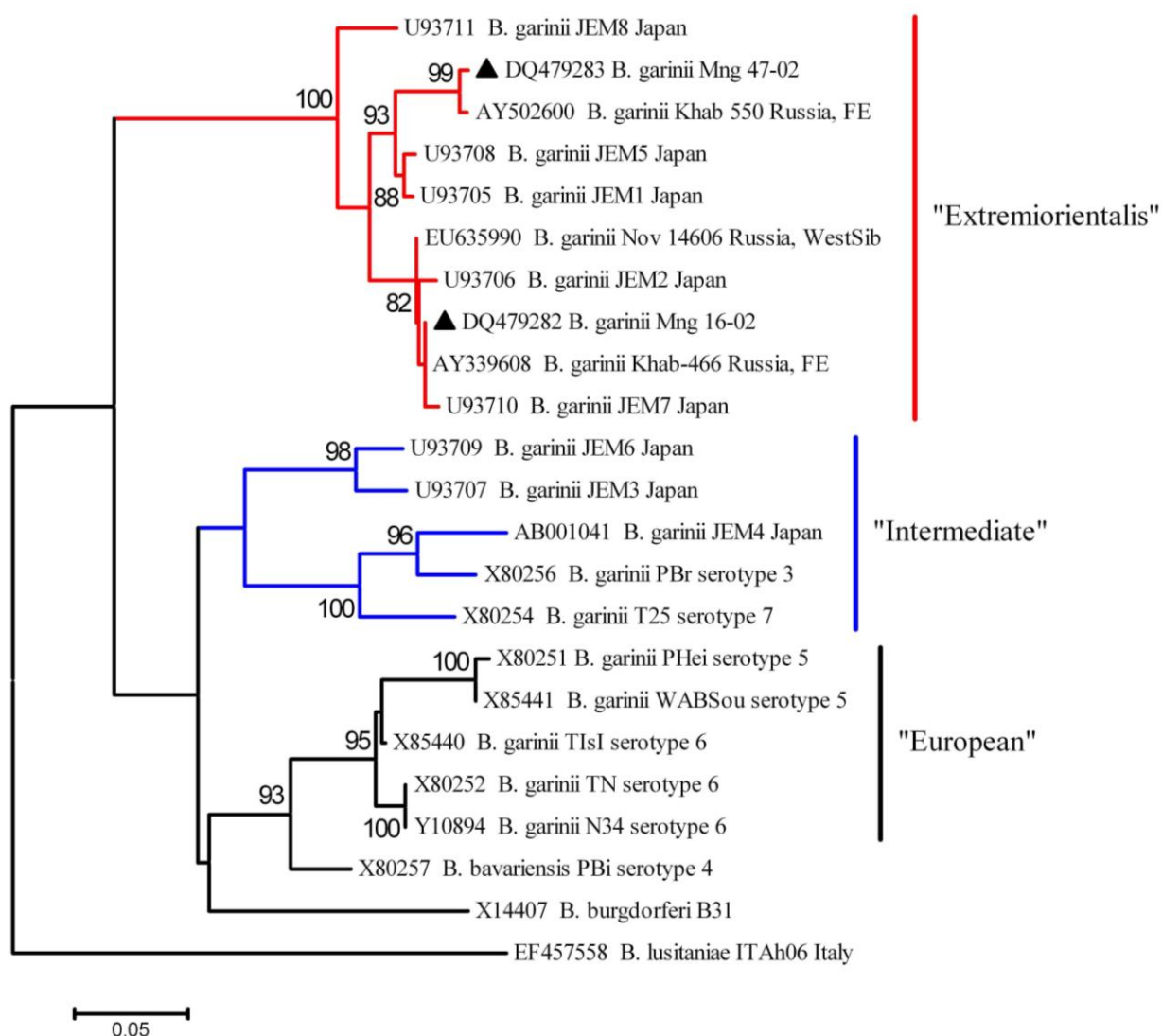
эффективен среди *B. afzelii*. Во-вторых, допускается существование экологического фактора стабилизирующего отбора *B. afzelii*, который исключает формирование локальных популяций со своеобразной структурой данного гена. Также можно отметить, что *OspA* *B. afzelii* позволяет им существовать в широком спектре естественных хозяев – изоляты от таежных клещей в Китае (изолят BaC22) и от больных людей в Германии (изоляты PLud, PHo) практически не отличаются по структуре гена *OspA* (рис. 4-9).



**Рисунок 4-9. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основании полных нуклеотидных последовательностей гена *OspA* *B. afzelii* с использованием метода Maximum Likelihood. Изоляты из Монголии обозначены черными треугольниками. Достоверность реконструкции устанавливали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 повторов, значения бутстреп-поддержки выше 50% отображены рядом с соответствующими узлами дендрограммы. Шкала генетической дистанции эквивалентна 0,01 нуклеотидной замене на сайт и приведена внизу. Анализ выполняли с помощью пакета программ MEGA 5.**

Расширенный анализ 111 изолятов *B. afzelii* из стран Западной Европы, Западной Сибири, Монголии и Дальнего Востока по фрагменту гена *OspA* длиной 344 н.о. подтвердил сделанные заключения (результаты доступны по запросу). Другие авторы также отмечают высокую степень сродства генов *OspA B. afzelii* на всем протяжении ареала в Евразии [Masuzawa Т. и др., 1996; Mediannikov О.У. и др., 2005].

Для филогенетического анализа *B. garinii* использованы полноразмерные нуклеотидные последовательности гена *OspA* 67 изолятов, однако, для иллюстративных целей на древе отображены только типовые штаммы основных внутривидовых групп этого вида и изоляты, наиболее эволюционно близкие монгольским *B. garinii* (рис. 4-10). На дендрограмме видно, что *B. garinii* в монгольских экосистемах по структуре гена *OspA* родственны скорее дальневосточным формам, нежели европейским – исследованные изоляты с высокой степенью достоверности относятся к группе «Extremiorientalis» (рис. 4-10) 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 включал в себя 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. В целом, этот кластер соответствовал группе 20047, выделяемой по последовательности межгенного спейсера *rrfA-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.



**Рисунок 4-10. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основании полных нуклеотидных последовательностей гена *OspA* *B. garinii* с использованием метода Maximum Likelihood. Изоляты из Монголии обозначены черными треугольниками. Достоверность реконструкции устанавливали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 повторов, значения бутстреп-поддержки выше 70% отображены рядом с соответствующими узлами дендрограммы. Шкала генетической дистанции эквивалентна 0,01 нуклеотидной замене на сайт и приведена внизу. Анализ выполняли с помощью пакета программ MEGA 6.**

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 *rrfA-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 *rrfA-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 широчайшим разнообразием по структуре любого из изученных фрагментов генома. Причем внутривидовая структура *B. garinii* варьирует в зависимости от используемого для анализа фрагмента. Это является 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.

#### 4.3. Разнообразие возбудителей клещевого риккетсиоза и близкородственных микроорганизмов пор. *Rickettsiales*.

С 2004 по 2011гг. мы провели исследование разнообразия микроорганизмов порядка *Rickettsiales* в Прибайкалье и Монголии с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа (см. Гл. 3 «Материалы и методы»). Из суммарной ДНК трех видов иксодовых клещей были амплифицированы и проанализированы два фрагмента генома альфа-протеобактерий – гена 16s рибосомальной РНК (16S rRNA) и гена поверхностного мембранного белка риккетсий (rOmpA) (табл. 4-6).

**Таблица 4-6.** 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. (%)
<b>Иркутская область</b>		
<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 %
<b>Монголия</b>		
<i>Dermacentor nuttalli</i> (n=142)	78 %	2,1 %
<i>I. persulcatus</i> (n=146)	46 %	43 %

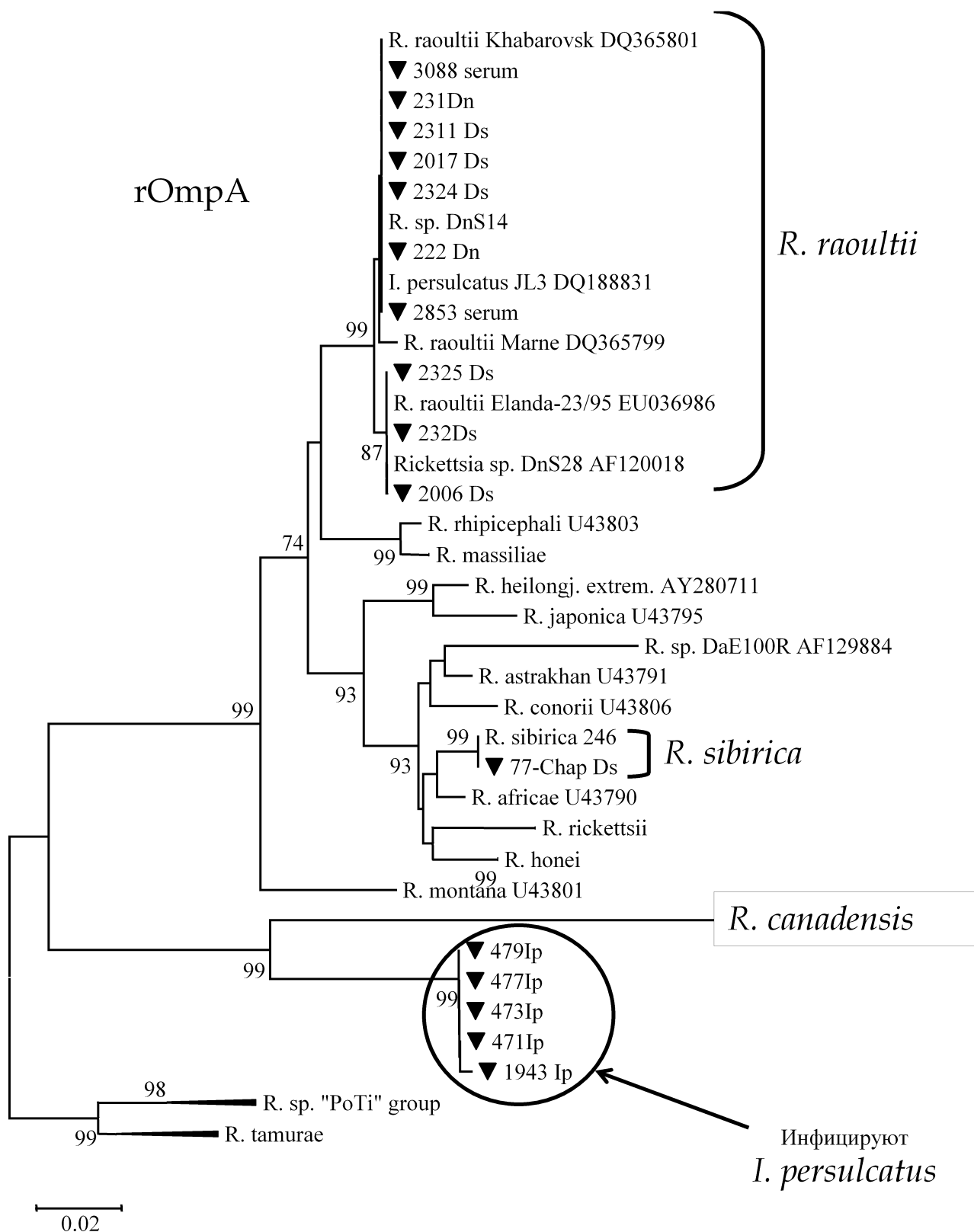
Анализ полиморфизма фрагмента гена rOmpA выявил циркуляцию в Прибайкалье и сопредельных районах Монголии, по меньшей мере, 3 видов риккетсий (рис. 4-11). Два из них – *R. sibirica* и *R. raoultii* - инфицируют клещей рода *Dermacentor*, зараженность степных клещей риккетсиями составила 64 – 78 %. Отмечено существенное преобладание *R. raoultii* – более 95 % (табл. 5-х), при этом четко выделяется 2 группы *R. raoultii* соответствующие двум прототипным изолятам DnS14 и DnS28 [Шулунов С.С. и др., 2007, Козлова И.В. и др., 2007]. В Прибайкалье выявлена циркуляция обоих субтипов, в то время как в Монголии обнаружен только субтип DnS14 (надо отметить, что выборка риккетсий была небольшой - семь образцов из Монголии против 21 из Иркутской области и Бурятии). Интересно, что в



Восточной Сибири два вида клещей рода *Dermacentor* – *D. nuttalli* и *D. silvarum* – распространены в равной степени и достигают сопоставимых показателей численности, тогда как в Монголии преобладает *D. nuttalli*. Исходя из этого, можно предположить, что различия в распространенности *R. raoultii* субтипов DnS14 и DnS28 связаны с адаптацией каждого из них к определенному виду клещей. При этом, гипотетически, DnS14 должны быть ассоциированы с клещами *D. nuttalli*, а DnS28 – с *D. silvarum*.

Еще один вид риккетсий обнаружен в клещах *I. persulcatus*, представляет собой отдельный вид наиболее родственный *R. canadiensis*, структура гOmpA этих риккетсий наиболее похожа - 85% сходства по нуклеотидной последовательности. На филогенетическом древе эти риккетсии с очень высокой степенью вероятности (бутстреп-поддержка 99%) также группируются в один кластер, но при этом формируют отдельные ветви с генетическими различиями видового уровня (рис. 4-11) [Данчинова Г.А., 2006; Шулунов С.С. и др. 2007].

Для оценки эпидемической значимости риккетсий были проанализированы 45 образцов ДНК из сывороток крови людей, заболевших лихорадкой неясной этиологии после укуса клеща [Козлова И.В. и др. 2007]. ДНК риккетсий обнаружена в 14 из них (31,1%). Клинические проявления у большинства из этих пациентов ограничивались первичным аффектом на месте укуса, лихорадкой, лимфаденитом и сыпью на теле. Исключение составили трое больных, в сыворотке крови которых наряду с ДНК риккетсий была обнаружена ДНК *B. garinii*. У этих больных заболевание протекало более тяжело, наблюдались признаки полинейроадикулопатии.



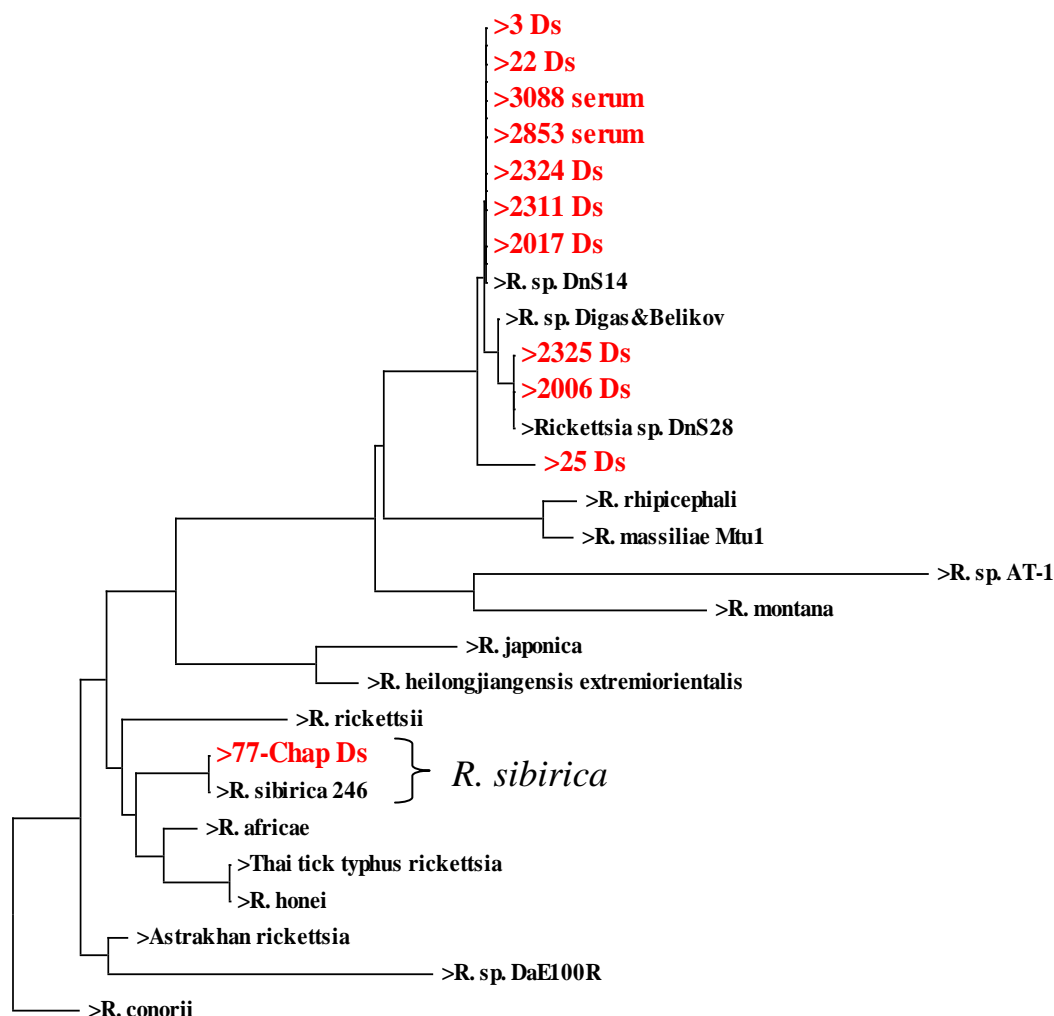
**Рисунок 4-11. Генетическое разнообразие риккетсий, инфицирующих иксодовых клещей в Прибайкалье и Монголии на основе анализа фрагмента гена rOmpA.** Анализ проводили с помощью метода neighbor-joining, достоверность реконструкции оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 псевдовыборок. Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 4 [Tamura, 2007].

Доступна детальная характеристика двух клинических случаев заболевания:

**Клинический случай 1.** Сыворотка № 2853 была взята у больного, в анамнезе которого присутствовали жалобы на высокую температуру (до 38,5 °С), головную боль, тошноту, появление сыпи по всему телу на 5 сутки с момента присасывания клеща. В сыворотке крови обнаружена ДНК *R. raoultii* DnS14, при этом результаты анализа на клещевой энцефалит и клещевой боррелиоз были отрицательными.

**Клинический случай 2.** Сыворотка № 3088 получена от больного, находящегося в реанимации городской клинической больницы № 10. У данного больного наблюдались признаки полинейрорадикулопатии. Нападение клеща произошло в Качугском районе Иркутской области. Кроме присутствия ДНК риккетсий *R. raoultii* DnS14, в крови было обнаружено присутствие *B. garinii*. Таким образом, у больного было установлено наличие микстинфекции КР и ИКБ. Сочетание двух инфекций привело к крайне тяжелому развитию заболевания.

Микстинфицирование возбудителями КР и ИКБ обнаружено также в сыворотке крови № 1796 (ДНК риккетсий + ДНК *B. garinii*). В сыворотке крови № 2245 было детектировано одновременно наличие РНК вируса КЭ, ДНК риккетсий и боррелий (*B. garinii*). У всех остальных больных, в сыворотках которых выявлена ДНК риккетсий, в анамнезе были указания на наличие лихорадки, первичного аффекта, лимфаденита или сыпи на теле. Анализ нуклеотидной последовательности четырех из 14 образцов (в т.ч. трех образцов от больных с микст-инфекциями) показал, что все они принадлежат виду *R. raoultii* субтипа DnS14 (рис. 4-12).



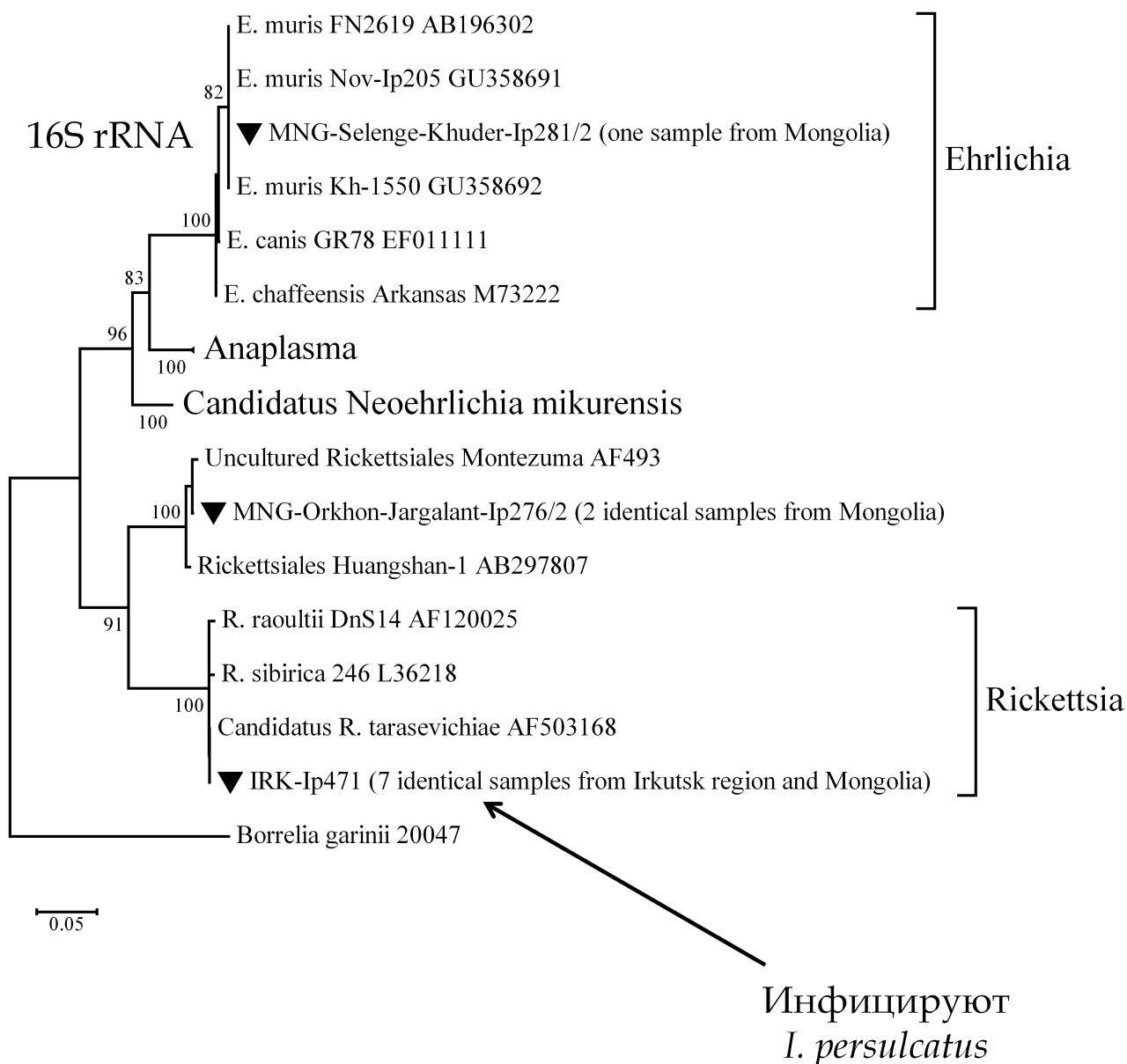
**Рисунок 4-12. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок.** Анализ проводили с помощью метода neighbor-joining на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gOmpA* длиной 337 пн. Образцы от клещей и больных людей, собранные на территории Иркутской области, выделены красным. Источник изоляции ДНК указан после номера образца: **Ds** – *Dermacentor silvarum*, **serum** – сыворотка крови больного. Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 4 [Tamura, 2007].

Изучение вариабельности гена 16S rRNA альфапротеобактерий в Прибайкалье выявило два существенных факта. Во-первых, оказалось, что инфицированность иксодовых клещей этими микроорганизмами очень высока – порядка 70 % степных и лесостепных клещей и порядка 30 % таежных клещей инфицированы риккетсиями и/или анаплазмами и эрлихиями (табл. 4-6). Во-вторых, анализ нуклеотидной последовательности ряда образцов гена 16S rRNA альфа-протеобактерий, полученных из клещей, выявил циркуляцию в таежных клещах как минимум еще трех видов бактерий. Наиболее распространенным видом является *Candidatus R.*

*tarasevichiae* – недавно описанный вид риккетсий с неясной пока патогенностью для людей, тогда как *Ehrlichia muris* и риккетсиеподобный микроорганизм «*Montezuma*» встречаются реже (рис. 4-13, табл. 4-7).

**Таблица 4-7.** Результаты видовой идентификации бактерий, инфицирующих иксодовых клещей в Иркутской области и Монголии.

Вид клеща-хозяина	<i>Dermacentor sp.</i>	<i>I. persulcatus</i>	
Ген	rOmpA	rOmpA	16S rRNA
Общее количество проанализированных образцов ДНК	29	20	17
<b>Из них идентифицированы как:</b>			
<i>R. raoultii</i>	28 (96,6%)	0	0
<i>R. sibirica</i>	1 (3,4%)	0	0
<i>R. tarasevichiae</i>	0	0	7 (41,2%)
<i>Rickettsia sp. "Irkutsk"</i>	0	20 (100%)	0
Микроорганизм « <i>Montezuma</i> »	0	0	2 (11,8%)
<i>E. muris</i>	0	0	1 (5,9%)
<i>Burkholderia sp.</i>	0	0	4 (23,5%)
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	3 (17,6%)



**Рисунок 4-13. Идентификация альфа-1-протеобактерий, инфицирующих таежных клещей в Прибайкалье и Монголии на основе анализа фрагмента гена 16S rRNA.** Анализ проводили с помощью метода neighbor-joining, достоверность реконструкции оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 псевдовыборок. Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 4 [Tamura, 2007].

Интересным фактом оказалось то, что ряд микроорганизмов, выявленных в клещах с помощью анализа вариабельности гена 16S rRNA, не относится к «классическим» клещевым патогенам - это гаммапротеобактерии наиболее родственные (98-100 % сходства по нуклеотидной последовательности) некультивируемым бактериям рода *Pseudomonas sp.* (номера последовательностей в GenBank GU458962, GU198124, GQ221034) и

*Burkholderia* sp. (GU352879, GQ149776, EF672050), обнаруженных в различных объектах окружающей среды – почве, листьях растений, отходах промышленных предприятий и т.п. (табл. 4-8).

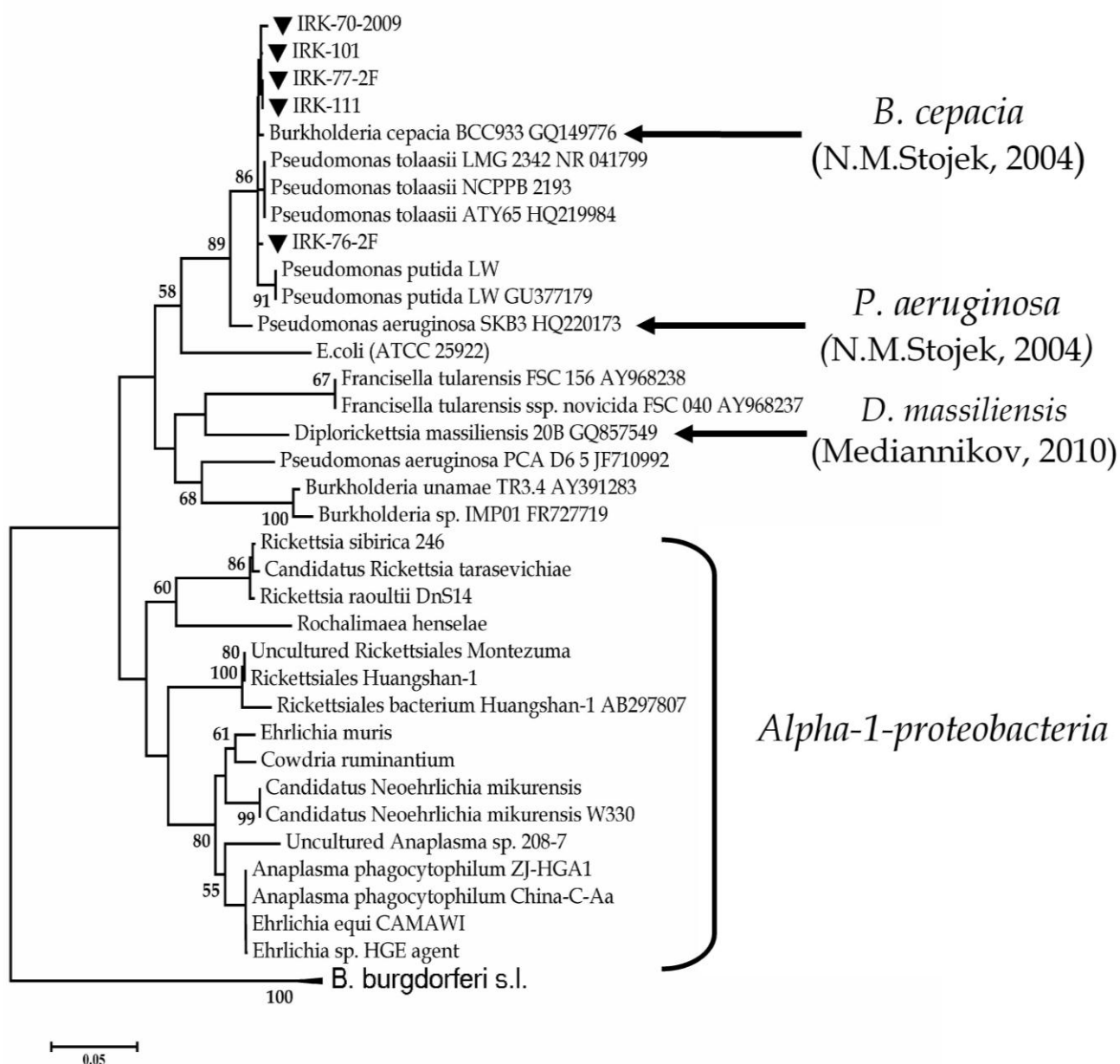
**Таблица 4-8.** Идентификация образцов 16S rRNA, не относящихся к альфа-1–протеобактериям, с помощью сервиса BLAST\*.

Образец	Идентичность нуклеотидных последовательностей (BLAST similarity scores)	Микроорганизм	Источник изоляции
IRK-70-2009	98-100%	Некультивируемые <i>Burkholderia</i> sp.	Объекты окружающей среды, сточные воды, образцы почвы
IRK-101			
IRK-77-2F			
IRK-111			
IRK-76-2F	99-100%	Некультивируемые <i>Pseudomonas</i> sp.	Объекты окружающей среды, яйца кур, образцы почвы

\* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Поскольку ближайшие родственники этих бактерий могут подолгу выживать в окружающей среде, то не ясно, инфицируют ли обнаруженные нами микроорганизмы клещей или они просто контаминируют наружные покровы клеща и не удаляются в процессе пробоподготовки. Мы проанализировали доступную литературу и выяснили, что в последние годы все чаще появляются сообщения о выявлении в иксодовых клещах новых бактерий, в том числе и гамма- и бета-протеобактерий. В частности, N.M. Stojek с соавторами [Stojek N.M. и др., 2004] было показано, что клещи *I. ricinus* могут быть заражены такими микроорганизмами как *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa*. О.В. Медянниковым с соавторами [Mediannikov O.V. и др., 2010] был описан новый вид гаммапротеобактерий, ассоциированных с клещами *I. ricinus* – *Diplorickettsia massiliensis*. Мы проанализировали филогенетические взаимосвязи обнаруженных микроорганизмов и выяснили, что все исследованные фрагменты геномов

эволюционно близки протеобактериям, ассоциированным с *I. ricinus* (рис. 4-14). Большая часть из них с высокой степенью достоверности кластеризуется с *Burkholderia cepacia*, а один образец занимает обособленное положение с наибольшим родством *Pseudomonas tollassii*.



**Рисунок 4-14. Идентификация атипичных протеобактерий, инфицирующих таежных клещей на основе анализа фрагмента гена 16S rRNA.** Стрелками указана локализация таксонов, описанных в соответствующих ссылках в правой части рисунка. Анализ проводили с помощью метода neighbor-joining, достоверность реконструкции оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 100 псевдовыборок. Расчеты выполняли с помощью программного пакета Mega 4 [Tamura, 2007].



Теоретически, в обоих случаях гаммапротеобактерии могут представлять угрозу для здоровья людей – если они инфицируют организм клеща, то могут передаваться человеку при укусе и питании паразита. Если же эти микроорганизмы присутствуют на наружных покровах клеща, то они могут попадать в организм человека механическим путем через рану, образующуюся при прокалывании клещом кожи хозяина.

Таким образом, иксодовые клещи на территории Монголии и Прибайкалья инфицированы, по меньшей мере, 5 видами микроорганизмов порядка *Rickettsiales* – *R. sibirica*, *R. raoultii*, *E. muris*, “*Montezuma*” и *Candidatus R. tarasevichiae*. Зараженность клещей этими микроорганизмами достигает высоких показателей. Порядка 70 % клещей рода *Dermacentor sp.* и 30-40 % клещей *I. persulcatus* инфицированы риккетсиеподобными бактериями. Неожиданно низкой оказалась зараженность *R. sibirica* – лишь 3,4 % всех риккетсий, обнаруженных в клещах *Dermacentor sp.* относятся к этому виду. Обнаружены риккетсии с необычной структурой гена *rOmpA*; высока вероятность того, что этот вариант *rOmpA* принадлежит *Candidatus R. tarasevichiae*. Кроме ожидаемых бактерий порядка *Rickettsiales*, анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA выявил инфицированность таежных клещей микроорганизмами вообще не относящихся к альфа-1-протеобактериям. Наиболее близкородственными им оказались гама- и бета-протеобактерии родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*.

По нашему мнению, все эти микроорганизмы способны устойчиво циркулировать в биоценозах Прибайкалья и Монголии в течение неограниченного времени. При этом, значение большинства из обнаруженных нами микроорганизмов для здоровья человека неясно, однако любой из них имеет возможность инфицировать человека при укусе клеща.

#### 4.4. Оценка возможностей экспериментального изучения влияния генетического разнообразия на циркуляцию клещевых патогенов в природе

Анализ генетического разнообразия ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato* и микроорганизмов порядка *Rickettsiales* показывают, что стабильное существование клещевых инфекций обеспечивается за счет формирования региональных популяций микроорганизмов, которые адаптированы к циркуляции в эндемичных видах позвоночных и беспозвоночных хозяевах. На генетическом уровне адаптивный процесс проявляется в формировании региональных внутривидовых генетических групп - появлении специфичных аминокислотных замен, ассоциированных с географическим местом изоляции микроорганизма и обусловленных характеристиками локальных экосистем (например, эволюционные линии ВКЭ, азиатские и евразийские геногруппы внутри *B. garinii* и *B. afzelii*), обособлении серотипов (например, OspA серотипы у *B. garinii*) и даже в образовании специализированных близкородственных видов (например, виды внутри комплекса *B. burgdorferi sensu lato*, адаптированные к разным позвоночным хозяевам, микроорганизмы пор. *Rickettsiales* *R. tarasevichiae*, *R. raoultii*, микроорганизм «*Montezuma*» адаптированное к разным видам клещей и т.п.). Эти процессы особенно заметны при анализе разнообразия генов поверхностных белков (например, гена E у ВКЭ, rOmpA у риккетсий, OspA у *B. burgdorferi sensu lato*), что отражает селекцию вариантов, способных наиболее эффективно циркулировать среди животных, распространенных в той или иной местности. При заносе в неспецифичные биоценозы любой из клещевых микроорганизмов способен некоторое время циркулировать среди неспецифичных хозяев, однако постепенно чужеродные формы клещевых патогенов вытесняются локальными популяциями микроорганизмов. Получается, что для устойчивой циркуляции клещевых инфекций необходима высокоспецифичная экосистема, которая содержит специфичный набор видов позвоночных и беспозвоночных хозяев.

Современное состояние исследований подтверждает сделанное выше заключение. Действительно, для каждой из рассматриваемых нами клещевых инфекций, непрерывно нарастает количество выделяемых видов, геновидов, внутривидовых групп, линий, и т.п. классификационных единиц. Этот процесс ускоряется по мере увеличения количества изученных изолятов, расширения географических границ исследований и спектра исследованных животных - хозяев и переносчиков клещевых микроорганизмов. Полученные результаты позволяют предположить, что описываемые современными исследователями генетические модификации ВКЭ, *B. burgdorefri sensu lato*, и микроорганизмов порядка *Rickettsiales* необходимы для адаптации клещевых микроорганизмов к достаточно узкому спектру специфичных животных, численность и плотность населения которых в данной местности обеспечивает эффективную циркуляцию клещевых микроорганизмов. Однако конкретные биологические мотивы формирования подобного разнообразия, молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к животным-хозяевам и экологические барьеры, препятствующие унификации микроорганизмов одного вида в пределах всего ареала обитания остаются малоизученными.

Для выяснения факторов, ограничивающих стабильную циркуляцию клещевых микроорганизмов пределами специфичной экосистемы, было бы целесообразно провести экспериментальные исследования, в которых можно оценить влияние конкретных генетических модификаций на эффективность разных стадий циркуляции клещевых инфекций. Для этого необходима адекватная модель, которая позволит изучить эти процессы в контролируемых условиях.

При этом, практическое проведение экспериментальных работ лабораторная биологическая модель для изучения влияния генетического разнообразия на циркуляцию клещевых патогенов в природе:

1. Наличие доступных живых систем для моделирования полного цикла циркуляции микроорганизма, в т.ч.: колония исходных клещей, лабораторная линия позвоночных хозяев, перевиваемые клеточные линии специфичных и неспецифичных хозяев;
2. Наименьший размер генома. Это позволит увеличить точность анализа за счет снижения компенсаторного и интерферирующего воздействия невовлеченных в эксперимент генов;
3. Реальные возможности по генетической модификации модельного микроорганизма, в т.ч. доступные технологии инфекционного клонирования, направленного мутагенеза и химеризации;
4. Существенная эпидемическая значимость исследуемого микроорганизма, что увеличивает вероятность практического использования результатов эксперимента;

После анализа современного состояния исследований было решено использовать в качестве модели вирус клещевого энцефалита на следующих основаниях:

- для ВКЭ есть широкий спектр лабораторных моделей, наиболее соответствующих природным аналогам, можно использовать стандартные линии иммунокомпетентных лабораторных мышей в качестве позвоночных хозяев, есть устойчивые лабораторные колонии специфичных клещей *I. ricinus*, есть хорошо изученные перевиваемые линии клеток млекопитающих для выращивания и тестирования репродуктивной способности ВКЭ (СПЭВ, ВНК-21, СЕ и др.). В отличие от ВКЭ, для моделирования инфекции *B. burgdorferi sensu lato* в позвоночных хозяевах требуются специальные

иммунодефицитные линии лабораторных мышей, а для *Rickettsiales* очень ограничен выбор клеточных культур.

- Геном ВКЭ составляет около 11 000 н.о., вся генетическая информация кодирована в единственной молекуле РНК. Три структурных и семь неструктурных генов экспрессируются в виде одного полипротеина, который ко- и посттрансляционно нарезается на соответствующие белки. Каждый белок выполняет 2-3 функции и в общей сложности геном ВКЭ кодирует порядка 20 функционально важных элементов, таких как мембранные домены белков ргМ и Е, рецепторный и соединительный домены и домен слияния белка Е, хеликазный и протеазный домены белка NS3 и др. Регуляция процессов вирусной репликации осуществляется с помощью двух нетранслируемых регионов. Компактная организация генома ВКЭ упрощает генетическую модификацию вируса и уменьшает интерференцию со стороны немодифицированных элементов в сравнительных экспериментах. Для сравнения, геном *B. burgdorferi sensu lato* кодирован в одной линейной хромосоме длиной порядка 900 000 н.о. и в порядка 20 линейных и кольцевых плаزمиде, которые могут циркулировать не только между штаммами одного вида боррелий, но и между разными видами *B. burgdorferi sensu lato*. Геном анаплазм представляет собой кольцевую молекулу ДНК длиной порядка 1 500 000 н.о., при этом в геноме каждого микроорганизма присутствует более 100 копий гена *ompA/p44*, отвечающего за взаимодействие с мембраной клетки хозяина и за избегание иммунного ответа [Dunning H.J.C. и др., 2006].

- Разработанная к настоящему времени система инфекционного клонирования ВКЭ требует сравнительно небольшого набора генноинженерных работ, реализуется в относительно короткие сроки (от нескольких недель до нескольких дней) и обеспечивает высокую воспроизводимость результатов (Gritsun T.S., 1998).

- ВКЭ представляет серьезную проблему современного здравоохранения. Так, в среднем по Российской Федерации, ежегодно

регистрируется 5-8 тыс. заболеваний, при этом смертность составляет от 0,2 до 30%, а возможности специфической профилактики и лечения ограничены единственным специфическим противовирусным препаратом – донорским иммуноглобулином. Подобная ситуация делает чрезвычайно актуальными любые исследования экологии ВКЭ, которые могут раскрыть новые возможности контроля этой инфекции.

## ГЛАВА 5.

### Изучение генетических детерминант ВКЭ, ассоциированных с изменением биологических свойств вируса

Расширение объемов исследования ВКЭ привело к тому, что в последние 20 лет был выявлен значительный полиморфизм биологических свойств ВКЭ. Так, группой В.В. Погодиной была выявлена группа ВКЭ (более 40 штаммов) отличающихся неспособностью агглютинировать эритроциты гусей. Кроме этого, данная группа штаммов, получившая название «антиген-дефектных», отличалась от типовых штаммов ВКЭ мелкобляшечным фенотипом в культуре клеток СПЭВ, пониженной комплемент-фиксирующей активностью и относительно высокой резистентностью к антителам сывороток крови больных КЭ (Погодина В. В. и др., 1992). Для установления генетических механизмов, обеспечивающих подобный полиморфизм биологических свойств, нами были исследованы 4 новых штамма данной группы изолированные в 1999 – 2001 гг. на территории Ярославской области от клещей *I. persulcatus* (Яр 48, Яр 71, Яр 114) и от погибшего больного ВКЭ (Яр 46-2) (табл. 5-1, рис. 5-1).



Вирус	Источник изоляции
Яр 46-2	Ткани мозга больного КЭ
Яр 48	<i>Ixodes persulcatus</i>
Яр 71	<i>Ixodes persulcatus</i>
Яр 114	<i>Ixodes persulcatus</i>

- утрачена гемагглютинирующая активность
- Мелкобляшечный фенотип в культуре клеток СПЭВ
- Пониженная комплемент-фиксирующая активность
- Относительно слабая инактивация сыворотками крови больных КЭ.

**Рисунок 5-1. Географическое место изоляции штаммов «Яр ВКЭ»** обозначено красной линией. Биологические свойства и источник изоляции приведены согласно [Погодина В. В. И др., 1992].

Инфекционность ВКЭ группы «Яр» (далее Яр-ВКЭ) в культуре клеток СПЭВ была идентична инфекционности близкородственного СИБ-ВКЭ «Васильченко» (табл. 5-1), использовавшегося в качестве контроля. Также, по результатам Western-блота, Яр-ВКЭ продуцировали сопоставимое с контрольным вирусом количество белка Е в клеточном супернатанте. Контрольный СИБ-ВКЭ «Васильченко» и инфекционный клон pGGVs, сконструированный на его основе, обладали ярко выраженной гемагглютинирующей активностью и, при оптимальной рН = 6,2, концентрация гемагглютининов в препаратах этих ВКЭ достигала титров 1:1280. Однако, все три Яр-ВКЭ оказались полностью неспособны агглютинировать гусиные эритроциты в широких пределах кислотности от рН = 5,75 до рН = 7. Гемагглютинирующая активность отсутствовала как в антигенах Яр-ВКЭ, изготовленных из препаратов мозга белых мышей, так и у антигенов полученных из культур клеток СПЭВ (табл. 5-1). В культуре клеток СПЭВ все Яр-ВКЭ имели четко выраженный мелкобляшечный фенотип (~1 мм, рис. 5-5).

**Таблица 5-1.** Характеристика и биологические свойства штаммов группы «ЯР- ВКЭ», контрольных ВКЭ и инфекционных клонов, моделирующих мутации в белке Е ВКЭ

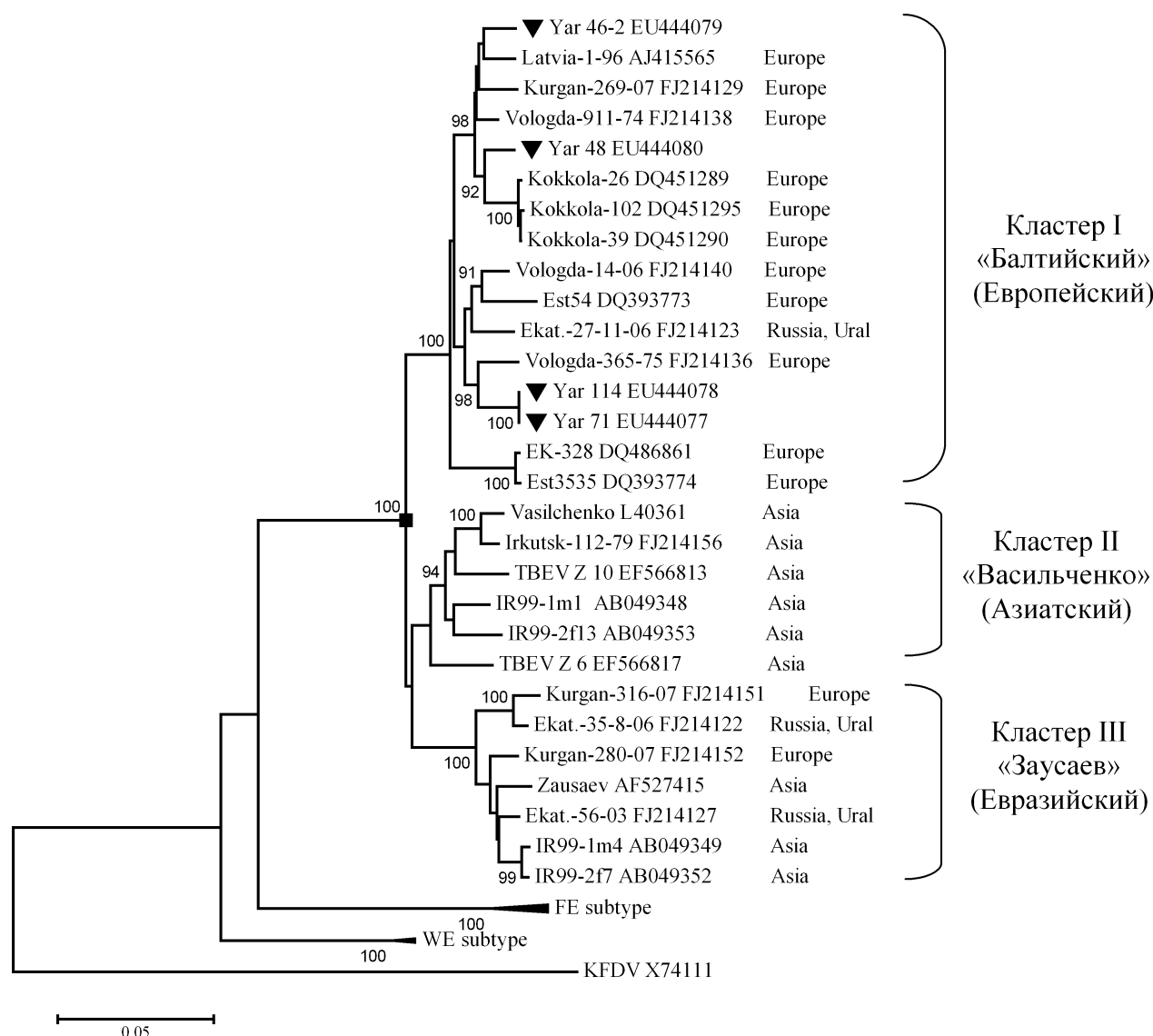
Изолят	Год изоляции	Источник изоляции	Пассажная история	Номер доступа GenBank	Титр гемагглютининов	Инфекционность ВКЭ в культуральной жидкости клеток СПЭВ через 72 часа, БОЕ\мл
Vs	1961	Сыворотка крови пациента	Н.И.*	L40361	1:1280	2-8x10 <sup>6</sup>
Yar 71	1999	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 7	EU444077	0	2-8x10 <sup>6</sup>
Yar114	2001	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 4 Мышь - 2	EU444078	0	2-8x10 <sup>6</sup>
Yar 46-2	2001	Ткани мозга пациента	СПЭВ - 5 мышь - 2	EU444079	0	2-8x10 <sup>6</sup>
Yar 48	2000	<i>I. persulcatus</i>	СПЭВ - 5	EU444080	0	2-8x10 <sup>6</sup>
pGGVs	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1		1:640	2-8x10 <sup>6</sup>
IC-D67G	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1		0	2-8x10 <sup>6</sup>
IC-E122G	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1		0	2-8x10 <sup>6</sup>
IC-D277A	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1		0	2-8x10 <sup>6</sup>
IC-T175N	2007	Инф. клон	СПЭВ - 1		1:640	2-8x10 <sup>6</sup>

\* Н.И. – нет информации



Поскольку гемагглютинирующая активность ВКЭ определяется структурой вириона и, прежде всего, белка Е, мы расшифровали и проанализировали нуклеотидные последовательности генов С, ргМ и Е этих изолятов. Для увеличения представительности выборки штаммов ВКЭ в филогенетическом анализе был использован фрагмент гена Е длиной 1110 н.о. (позиции 1114-2224 в нумерации генома ВКЭ «Васильченко» L40361).

Оказалось, что все Яр-ВКЭ, как и контрольный вирус «Васильченко», относятся к СИБ субтипу ВКЭ. Общая топология древа соответствует ранее опубликованным результатам [Ecker M. и др., 1999; Hayasaka D и др., 2001] (рис. 5-2). Вирусы Сибирского субтипа с высокой степенью достоверности (бутстреп-поддержка соответствующих узлов 94-100%) разделяются на 3 кластера, которые ассоциированы с географическим местом изоляции ВКЭ. В кластер I входят вирусы «Балтийской» линии ВКЭ [Golovljova I. и др., 2008], которые были изолированы только в Европейской части континента. Кластер II объединяет ВКЭ линии «Васильченко», обнаруженные только в Азии, и кластер III включает в себя вирусы линии «Заусаев» наиболее характерные для Урала и Западной Сибири но встречающиеся как в Европе так и в Азии [Gritsun T.S. и др., 2003]. Яр-ВКЭ с высокой степенью достоверности относятся к «Балтийской» линии ВКЭ и группируются с разными штаммами ВКЭ внутри кластера I (рис. 5-2). Полученные результаты подтверждаются анализом более длинного фрагмента генома, кодирующего структурные гены, а также отдельных генов С, ргМ и Е на меньшей выборке штаммов ВКЭ (иллюстрации не приведены, однако доступны по запросу).



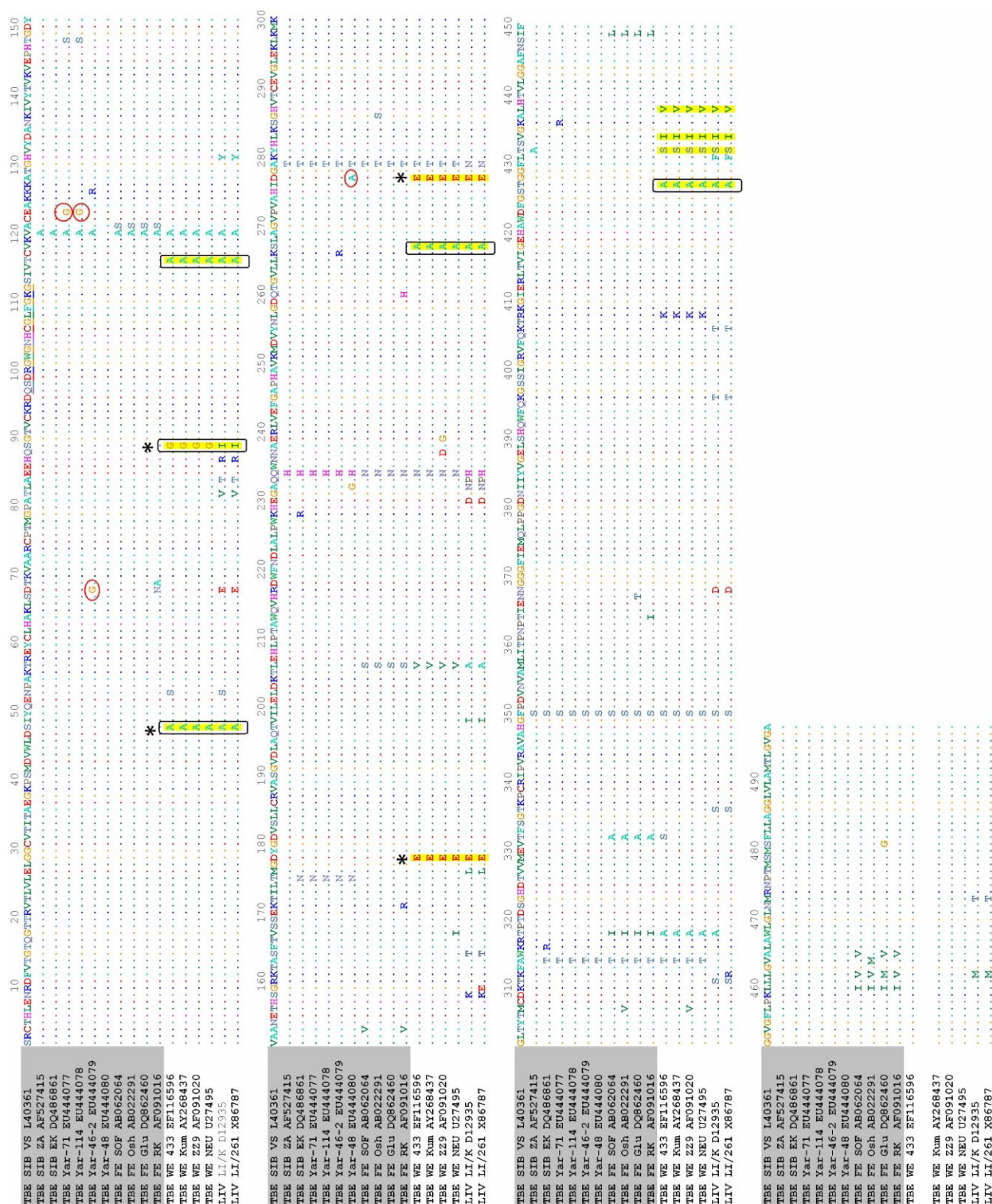
**Рисунок 5-2. Филогенетическое древо СИБ-ВКЭ на основе анализа фрагмента генома ВКЭ между нуклеотидными позициями 1114 – 2224 (согласно нумерации последовательности изолята «Васильченко» L40361). Топологию древа устанавливали методом Neighbor-Joining, эволюционные дистанции рассчитывали на основе модели Тамура-Неи, 1993 [Tamura K, Nei M, 1993]. Достоверность кластеризации оценивали с помощью бутстреп анализа на основе 1000 псевдовыборок, отображены значения бутстреп поддержки 90% и выше. Шкала отображает количество нуклеотидных замен на сайт. Географическое происхождение каждого изолята СИБ-ВКЭ и основные кластеры отображены с правой стороны древа. Исследуемые штаммы обозначены черными треугольниками. В качестве аутгруппы использован вирус киассанурской лесной болезни. Расчеты и построение древа производили с помощью программы MEGA version 4 [Tamura K. и др., 1997].**

Для выявления аминокислотных замен, потенциально ответственных за утрату гемагглютинирующей способности Яр-ВКЭ, был проанализирован элайнмент 290 полных аминокислотных последовательностей белка Е,

доступных в базе данных GenBank (рис 5-3). Обнаружена только одна общая мутация, свойственная группе Яр-ВКЭ: в позиции 175 все Яр-ВКЭ имеют аспарагин, тогда как у всех остальных ВКЭ данная позиция высококонсервативна и содержит треонин (рис. 5-3). Мы ввели мутацию T175N в инфекционный клон pGGVs и сравнили гемагглютинирующую активность мутантного ВКЭ IC-T175N с контрольными ВКЭ. Оказалось, что IC-T175N способен агглютинировать гусиные эритроциты в титрах до 1:640, что сопоставимо с титрами гемагглютининов в контрольных ВКЭ (Табл. 5-1). Далее было сделано предположение, что «антиген-дефектный» фенотип определяется индивидуальным полиморфизмом невзаимосвязанных аминокислотных позиций.

Углубленный анализ элайнмента выявил 3 неконсервативные мутации, 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). Каждая из них экспонирована на поверхности вириона и картируется в наиболее выступающих петлях белка E в нативной двумерной конформации (рис. 5-4). По сравнению с контрольными ВКЭ «Васильченко» и pGGVs, каждая из этих замен приводит к повышению заряда и гидрофобности белка E [Mandl C.W. и др., 2001; Kozlovskaya L.I. и др., 2010]. Также, мутация E122G была ранее ассоциирована с утратой гемагглютинирующей способности ВКЭ при адаптации к клещам *Hyalomma marginatum* [Romanova L.Iu. и др., 2007]. Молекулярные механизмы взаимодействия вирионов ВКЭ и мембран эритроцитов при гемагглютинации до настоящего времени не изучены, однако предполагается, что гемагглютинация осуществляется скорее тримерами белка E в конформации пост-слияния мембран, а не нативными димерами [Stiasny K и др., 2006]. Обнаруженные мутации были также картированы на модель кристаллической структуры белка E в тримерной конформации [Bressanelli S.

и др., 2004]. Оказалось, что в этом случае также все три мутации экспонированы на поверхности тримеров и локализованы в наиболее вступающих латеральных петлях.

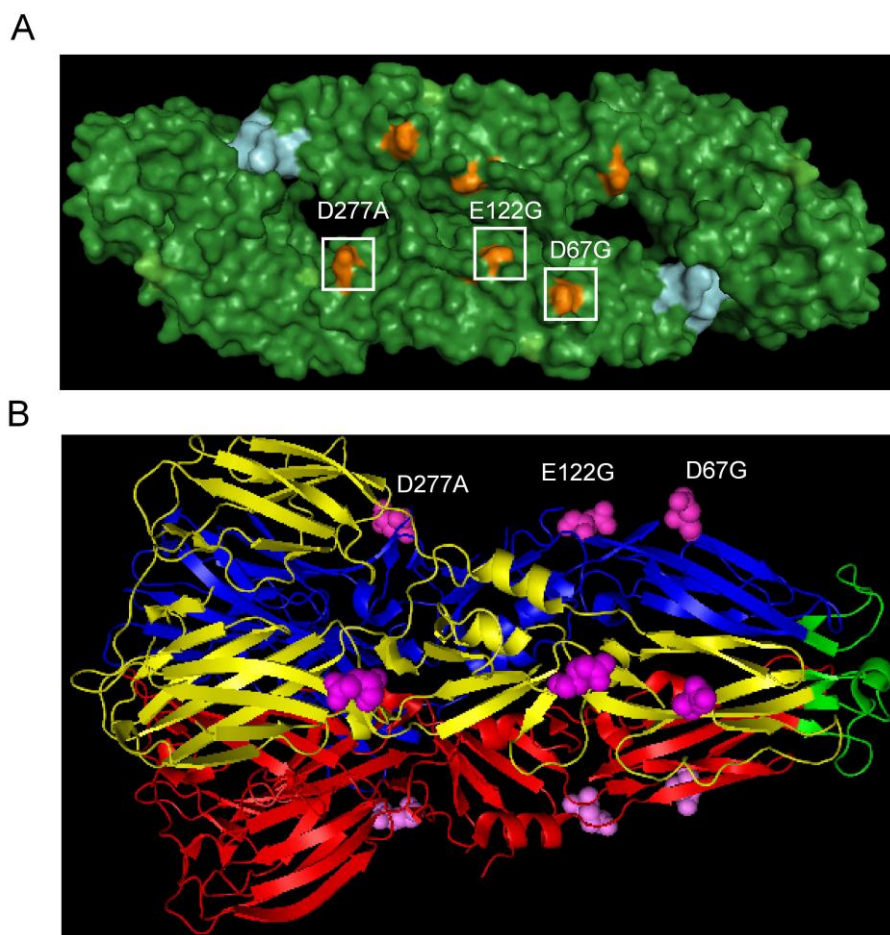


**Рисунок 6-3. Анализ мутаций в белке Е у вирусов группы Яр-ВКЭ.** Выборочный сравнительный элайнмент ВКЭ трех субтипов. В названии последовательности указана субтиповая принадлежность (TBE SIB – СИБ ВКЭ, TBE FE –



ДВ-ВКЭ, TBE WE – E-ВКЭ), штамм и номер доступа в GenBank. Мутации, приводящие к потере гемагглютинирующей активности ВКЭ, обведены красной линией. Аминокислотные замены, отличающие ВКЭ, переносимые *I. persulcatus* от ВКЭ переносимых *I. ricinus*, обозначены желтой тонировкой фона; мутации, приводящие к повышению гидрофобности локуса обведены черным прямоугольником; позиции, локализованные на поверхности вириона обозначены (\*). Пептид слияния подчеркнут.

Подобная локализация переменных позиций делает возможным их прямой контакт, как с поверхностью эритроцитов, так и между собой (рис. 5-4). Результаты анализа позволяют предположить, что каждая из обнаруженных мутаций способна независимо сформировать «антиген-дефектный» фенотип и ингибировать гемагглютинирующую способность ВКЭ.

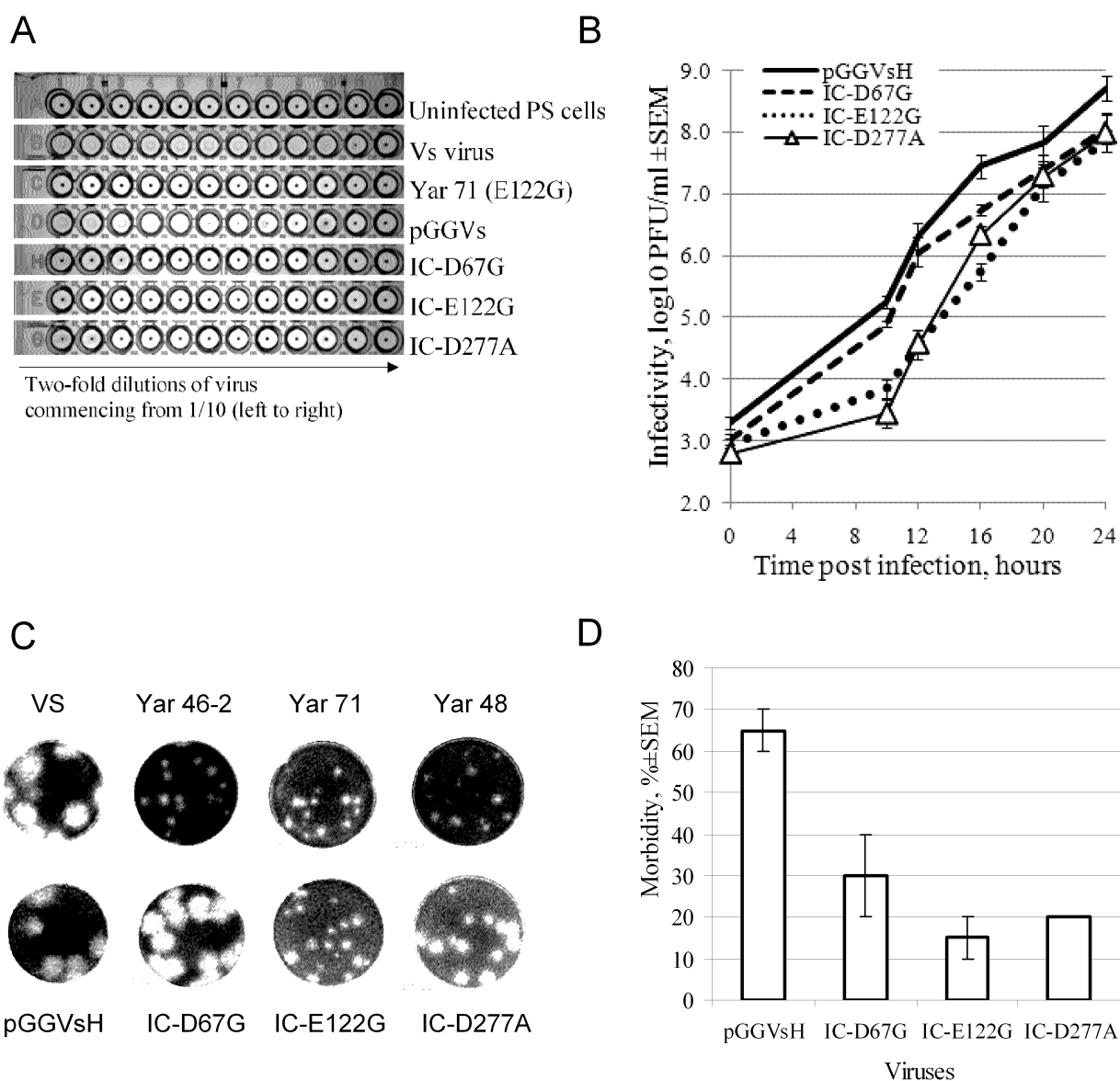


**Рисунок 5-4. Картирование мутаций, ингибирующих гемагглютинирующую способность ВКЭ** А) на поверхности димера белка Е ВКЭ в нативной конформации. Мутации выделены оранжевым цветом, пептид слияния окрашен в голубой. Моделирование белка Е выполнено на основе кристаллической структуры 1SVB.pdb [Rey F.A. и др., 1995]. В) в структуре тримера белка Е в конформации слияния с мембраной клетки. Пурпурные сферы моделируют расположение

ионизированных боковых цепей мутированных аминокислот в позициях 67, 122 и 277. Разные субъединицы триммера обозначены красным, синим и желтым цветом, пептиды слияния обозначены зеленым и направлены к поверхности гипотетической мембраны клетки. Моделирование белка Е выполнено на основе кристаллической структуры 1SVB.pdb (A) и 1URZ.pdb [Bressanelli S и др., 2004].

Для проверки этой гипотезы соответствующие аминокислотные замены были введены в геном СИБ-ВКЭ и получены мутантные штаммы IC-D67G, IC-E122G и IC-D277A. Оказалось, что введение любой из трех мутаций приводит к полной утрате гемагглютинирующих свойств ВКЭ (табл. 5-1, рис. 5-5 А).

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 несколько лучше, чем у IC-E122G и IC-D277A, однако также отмечалось некоторое снижение ростовых характеристик по сравнению с контрольным вирусом pGGVs (рис. 5-5В). Тем не менее, через 72 часа все ВКЭ достигали сопоставимых титров (Табл. 5-1).



**Рисунок 5-5.** А) Мутации D67G, E122G и D277A в белке Е полностью ингибируют способность ВКЭ агглютинировать эритроциты гуся. Показаны результаты реакции гемагглютинации при  $pH = 6,2$  и дозе антигена  $1-4 \times 10^7$  БОЕ на каждую лунку. В) Мутации D67G, E122G и D277A вызвали задержку репликации ВКЭ в культуре клеток СПЭВ на ранних стадиях инфекции. Множественность инфекции составляла 1 БОЕ на каждую клетку. 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 инфекционных клонов ВКЭ, содержащих мутации D67G, E122G и D277A. D) Вирулентность мутантных ВКЭ для лабораторных белых мышей при интраперитонеальном заражении (2000 БОЕ на мыш).

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  $3,0 \pm 0,2$  мм. Однако лишь 2 созданных мутанта - IC-E122G и IC-D277A - имели мелкобляшечный фенотип

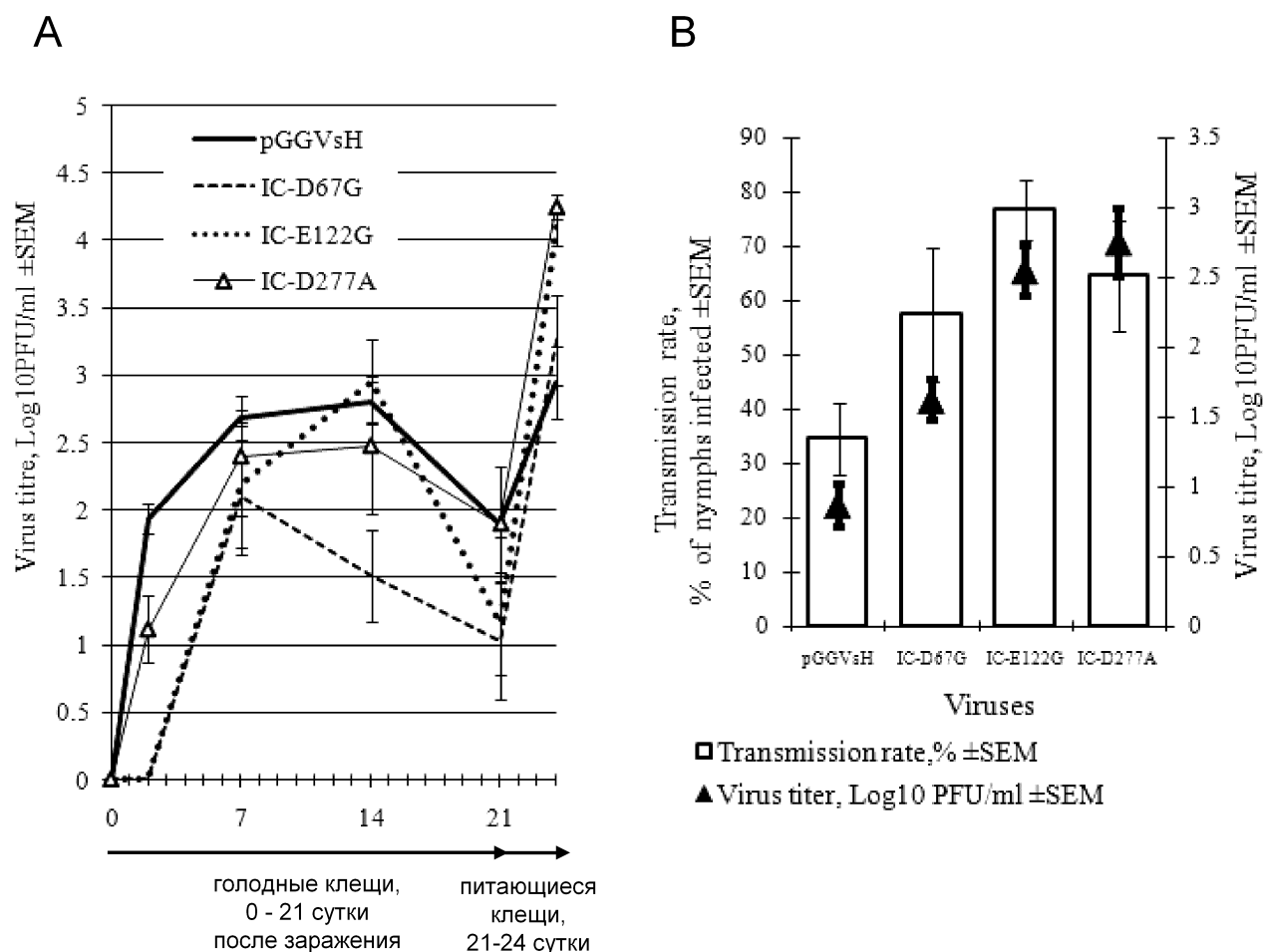
(средний диаметр бляшек  $1,3 \pm 0,2$  и  $1,5 \pm 0,3$  мм соответственно), а размер бляшек IC-D67G не отличался от контрольного вируса pGGVs ( $3,0 \pm 0,3$  мм), что свидетельствует о наличии в геноме Яр 46-2 дополнительных мутаций, модифицирующих его репродукцию в клетках СПЭВ (Рис. 5-5 С). Все 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).

Интраперитонеальное заражение белых мышей вирусом pGGVs приводило к относительно высокой смертности (65 %) по сравнению с ранее полученными данными [Gritsun T.S. и др., 2001]. Однако все 3 мутантных вируса обладали пониженной нейроинвазивностью и вызывали гибель 15-30 % животных (рис. 5-5 D). Выжившие мыши находились под наблюдением до 21 дня после заражения, после чего у них выявляли титр специфических антител к ВКЭ, который варьировал от 1:20 до 1:80, что служит подтверждением инфекции.

Для изучения репродукции ВКЭ в иксодовых клещах и эффективности неvirемической трансмиссии было проведено два эксперимента. В первом из них по 30 самок пастбищных клещей *I. ricinus* были заражены инъекцией 500 БОЕ каждого вируса (см. Гл. 4 «Материалы и методы») и содержались голодными в течение 21 дня. На 2, 7, 14 и 21 сутки после заражения у 6 клещей были определены титры ВКЭ в слюнных железах. Оставшихся клещей прокармливали на белых мышах в течение 3 суток, а затем также определяли титр ВКЭ в слюнных железах. 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. 6-6 А). После 3 дней питания концентрация ВКЭ в слюнных железах *I. ricinus* во всех случаях резко возрастала. Однако, если титр контрольного вируса pGGVs увеличивался в 10 раз, то титры IC-D67G и IC-D277A вырастали в



300 раз, а титр IC-E122G увеличивался в 1000 раз. 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 pGGVs и IC-D67G, титры которых варьировали от 2,6 до 3,6 lg БОЕ/мл.



**Рисунок 5-6. Влияние мутаций D67G, E122G и D277A на репродукцию ВКЭ в клещах *I. ricinus*** А) Самок *I. ricinus* заражали IC-D67G, IC-E122G IC-D277A или pGGVsH ВКЭ (день 0) и определяли титры инфекционного вируса в слюнных железах клещей на 2, 7, 14 и 21 день после заражения. С 21 по 24 день самок прокармливали на лабораторных белых мышах и определяли итоговый титр ВКЭ в слюнных железах после завершения питания. В) Для оценки эффективности невинерической трансмиссии, 15 незараженных нимф прикрепляли к мыши в непосредственной близости от 2 зараженных самок *I. ricinus* и позволяли им питаться до отпадения. Затем определяли титр инекционного ВКЭ в нимфах. Эффективность невинерической трансмиссии выражали как долю зараженных нимф из общего числа закончивших питание (% , белые прямоугольники). Черные треугольники обозначают средний титр ВКЭ в инфицированных нимфах для каждого из исследованных ВКЭ.

Во втором эксперименте была оценена эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ от зараженных инъекционным путем 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 pGGVs (рис. 6-6B). Корреляции между титрами ВКЭ в самках на 21 или 24 день после заражения и эффективностью неvirемической трансмиссии не выявлено (рис. 5-6).

Чтобы установить распространенность подобных вариантов ВКЭ в природе и оценить их эволюционную, экологическую и эпидемиологическую роль, были проанализированы аминокислотные последовательности фрагментов белка E 290 изолятов ВКЭ. В анализе учитывали замены заряженных аминокислот гидрофобными или нейтральными аминокислотами в позициях, экспонированных на поверхности белка E и\или вириона ВКЭ (табл. 5-2). В целом, такие мутации были обнаружены у 5,8% изолятов ВКЭ (включая Яр-ВКЭ, исследованные в данной работе). Штаммы с потенциально повышенным зарядом и\или гидрофобностью поверхности белка E 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. В общей сложности 17 мутаций были локализованы в позициях 67, 84, 122, 155, 170 и 203. Наиболее часто, в 47% случаев (8 изолятов), встречались замены в позиции 67, при этом все ВКЭ, содержащие замену были в большинстве случаев изолированы от больных людей, либо от мышевидных грызунов (Табл. 5-2). Принимая во внимание результаты о хороших репродуктивных способностях мутантного ВКЭ IC-D67G в культуре клеток почки эмбриона свиньи (рис. 6-5 B и C), мутации в позиции 67 белка E ВКЭ могут расцениваться как адаптивные к организму

млекопитающих и служить маркером повышенного риска развития заболевания у зараженного человека.

К сожалению, информация об источниках изоляции штаммов группы DAXL из Китая не доступна, поэтому анализ ассоциации других мутаций с группами хозяев на основании имеющихся данных будет неполным.

**Таблица 5-2.** Распространенность аминокислотных замен, которые приводят к изменению заряда и/или гидрофобности поверхности белка E ВКЭ (среди 290 изолятов)

Мутация	Изолят ВКЭ	Номер доступа GenBank	Субтип ВКЭ	Источник изоляции	Регион изоляции	Клинические проявления инфекции
E67 (D/G)	Est2546	DQ393779	ДВ	<i>Apodemus agrarius</i>	Эстония	Н.И.*
	T-blood	AF091019	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Урал	Менингоэнцефалит
	Ural-Nina	FJ214119	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Урал	Менингоэнцефалит
	Ponomarev	FJ214118	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Урал	Н.И.
	Ural-Belyaeva	FJ214117	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Урал	Н.И.
	Ural-Antipov	FJ214115	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Урал	Н.И.
	Volkhov	FJ214114	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Европейская часть	Хронический клещевой энцефалит, летальный исход
E67 (D/N)	RK 1424	AF091016	ДВ	<i>I. persulcatus</i>	Латвия	Н.И.
E84 (E/K or E/G)	1486	EF469755	СИБ	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Зап. Сибирь	Н.И.
	4387/7	X76608	Е	<i>I. ricinus</i>	Словакия	Н.И.
E122 (E/G)	DXAL5	AY178833	ДВ	Н.И.	Китай	Н.И.
	KrM219	DQ988684	Е	<i>Rodentia spp.</i>	Южная Корея	Н.И.
E155 (E/G)	272-75	AF231806	СИБ	<i>Myodes rufocanus</i>	РФ, Вост. Сибирь	Н.И.
E170 (E/G)	Koltsovo-29	AF540032	ДВ	<i>Homo sapiens</i>	РФ, Зап. Сибирь	Н.И.
E203 (D/G)	DXAL-12 DXAL-13 DXAL-21	EU089977 EU089976 EU089980	ДВ	Н.И.	Китай	Н.И.

\* Н.И. – нет информации

Большинство проанализированных на этом этапе последовательностей белка Е (227 из 290) расшифрованы лишь частично и дают неполное представление об истинной распространенности ВКЭ с измененным зарядом и/или гидрофобностью поверхности белка Е в природе. Поэтому мы проанализировали набор из 337 полноразмерных последовательностей белка Е ВКЭ опубликованных в GenBank к осени 2014г. на наличие соответствующих мутаций в позициях 67, 84, 122, 155, 170 и 203.

Всего обнаружено 23 изолята (6,8 %) что соответствует встречаемости данных мутаций в выборке фрагментарных последовательностей. Наиболее распространенными оказались мутации в позиции 67, которые составляли 47,8% (11 изолятов) от общего числа обнаруженных мутантов. Однако в данном наборе последовательностей преобладала мутация D67N встречающаяся как в изолятах от больных людей, так и в изолятах от иксодовых клещей. 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. Однако можно предположить, что подобные варианты ВКЭ могут играть серьезную 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.

Кроме того, мы сравнили последовательности белка Е у ВКЭ, изолированных от *I. ricinus* (Е-ВКЭ) и от *I. persulcatus* (ДВ- и СИБ-ВКЭ) чтобы выявить аминокислоты, потенциально вовлеченные в процесс адаптации ВКЭ к специфическому переносчику (рис. 5-3). Было выявлено 10 аминокислотных замен, которые отличали Е-ВКЭ от СИБ- и ДВ-ВКЭ, причем 5 из них приводили к повышению гидрофобности поверхности белка Е. Четыре мутации локализованы на поверхности вириона, причем 2 из них (S47A и S88G) приводят к повышению гидрофобности соответствующих локусов белка Е, а другие 2 (D178E и D277E) были консервативны. Две

мутации, приводящие к увеличению гидрофобности, были локализованы либо внутри белка E (T115A) либо на поверхности димера белка E, обращенной к мембране вириона (S267A). Еще 4 специфичные замены были локализованы в трансмембранном домене белка E (T426A, T431S, V433I и L437V), причем одна из них (T427A) приводила к увеличению гидрофобности соответствующего участка белка E (рис. 5-3). Интересно, что выявленные мутации практически полностью совпадают с маркерными аминокислотами субтипа E-ВКЭ, описанными М. Ecker с соавт. [Ecker М. и др., 1999] то есть, в отличие от изученных мутаций, носят систематический характер.

Таким образом, 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 E и могут изменяться вследствие несистематических, спонтанных мутаций. Эти мутации локализуются в экспонированных на поверхности вириона локусах белка E, приводят к увеличению гидрофобности поверхности вириона и не совпадают с систематическими маркерными аминокислотными заменами, отражающими адаптацию ВКЭ к специфическому спектру хозяев.

## ГЛАВА 6

### Изучение влияния генетического разнообразия ВКЭ на циркуляцию вируса в условиях контролируемого эксперимента

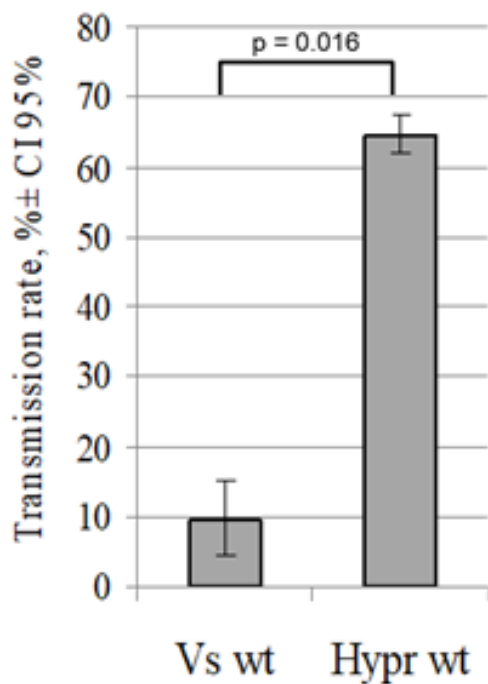
В ходе предыдущих исследований нами было установлено два факта. Во-первых (см. «Глава 3...»), генетическое разнообразие ВКЭ ассоциировано с географическим местом изоляции вируса в условиях широкой географической протяженности ареала и полиморфизма экологических факторов, таких как разнообразие прокормителей клещей, погодных условий, полиморфизм беспозвоночных хозяев (прежде всего *I. persulcatus* и *I. ricinus*), наличие и спектр симпатричных видов клещей, которые могут играть роль дополнительных переносчиков вируса и другие. Во-вторых (см. «Глава 5...» данной рукописи), адаптивные возможности ВКЭ (прежде всего способность к трансмиссии между инфицированными и неинфицированными клещами) во многом определяются структурой гена белка Е и, возможно, других генов, кодирующих структурные белки ВКЭ. Ранее многими авторами было показано, что Е-ВКЭ и СИБ-ВКЭ обитают в условиях симпатрии, населяя одни и те же биоценозы восточной Европы и Европейской части РФ. При этом каждый из субтипов сохраняет эволюционную самостоятельность, предположительно за счет узкой специализации к организму клеща – Е-ВКЭ инфицирует луговых клещей *I. ricinus*, а СИБ-ВКЭ циркулирует среди таежных клещей *I. persulcatus*.

### **6.1. Сравнение эффективности неvirемической трансмиссии СИБ-ВКЭ и Е-ВКЭ между клещами *I. ricinus* – специфическими переносчиками Е-ВКЭ.**

Мы попытались изучить, каким образом генетические особенности ВКЭ влияют на эффективность циркуляции вируса между зараженными и незараженными клещами специфичного для Е-ВКЭ вида *I. ricinus*. Для этого на первом этапе, в стандартизованных лабораторных условиях, сравнили эффективность репродукции и циркуляции между клещами двух типовых штаммов СИБ-ВКЭ и Е-ВКЭ.

Взрослых самок *I. ricinus* заражали инъекцией 500БОЕ ВКЭ штамма Нург (Е-ВКЭ) или Васильченко (СИБ-ВКЭ, далее Vs). Зараженных клещей инкубировали при 24°C в течение двух недель, как описано в главе 4 «Материалы и методы». После этого, две инфицированные самки и 15 незараженных нимф были присажены в питательную камеру, прикрепленную на коже лабораторной мыши, и оставлены для совместного питания. Эта процедура проводилась в 4 независимых повторах для каждого вируса. Через 3 дня напивавшихся клещей удаляли с прокормителя и определяли инфекционный титр ВКЭ в нимфах и в слюнных железах самок для определения эффективности репродукции ВКЭ в *I. ricinus* на разных стадиях развития. Эффективность трансмиссии (ЭТ) вируса определяли как долю (в процентах) зараженных нимф среди всех напивавшихся.

В среднем, ЭТ штамма Нург составляла 65 %, тогда как у штамма Васильченко (Vs) этот показатель варьировал от 5 до 15 % (рис. 6-1). 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 повышение ЭТ штамма Нург между специфичными клещами *I. ricinus*.



**Рисунок 6-1. Сравнение эффективности неvirемической трансмиссии СИБ-ВКЭ («Vs wt») и Е-ВКЭ («Hypr 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 Hypr на гомологичные гены инфекционного клона штамма Васильченко и наоборот. 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*.

## 6.2. Конструирование рекомбинантных ВКЭ на основе типовых штаммов Сибирского (Vs) и Западно-Европейского (Hypr) субтипов

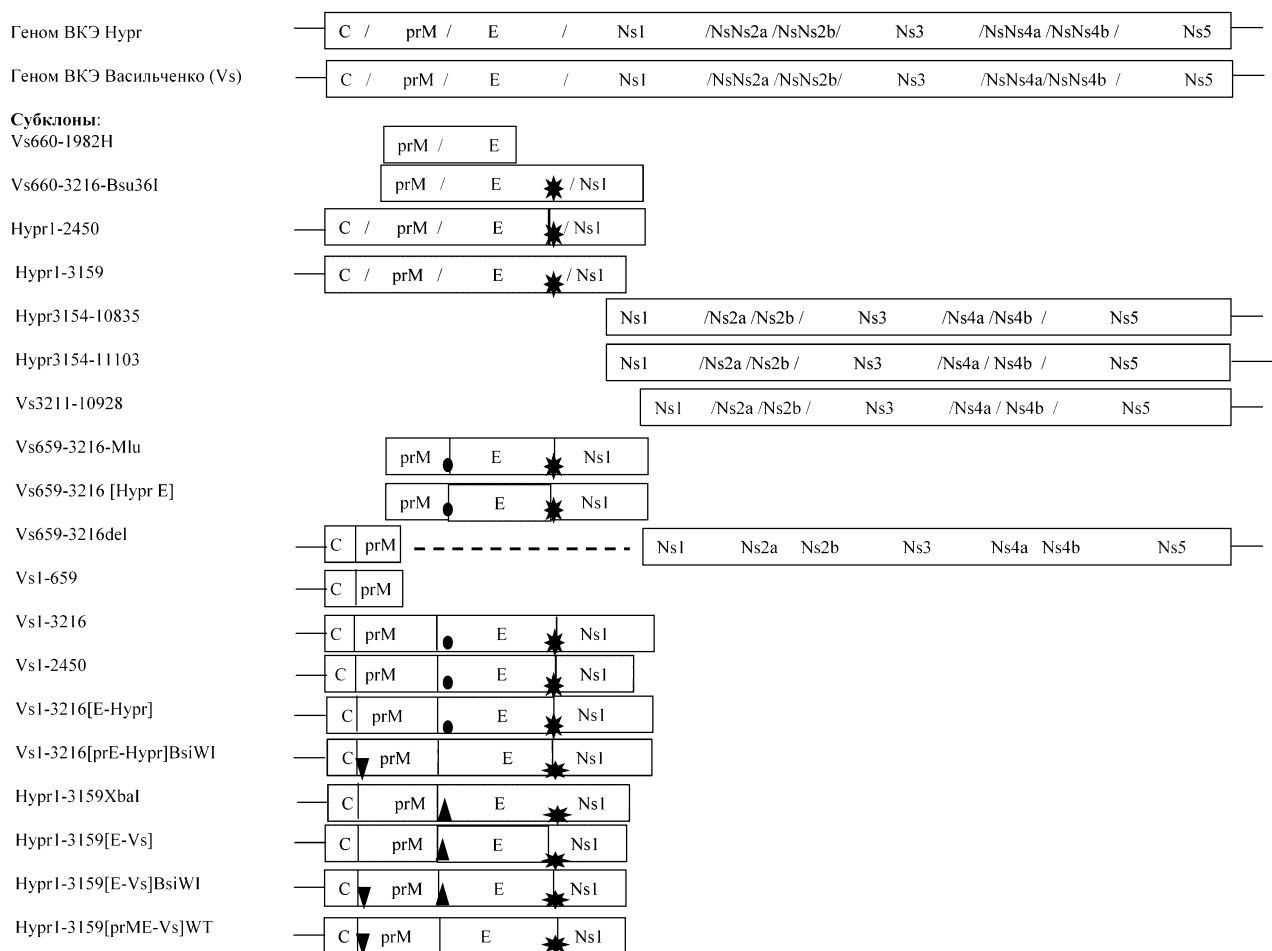
Ранее был описан метод быстрого создания и модификации инфекционных клонов флавивирусов с использованием длинноразмерной высокоточной ОТ-ПЦР. При этом, для проведения воспроизводимых экспериментов по мутагенезу инфекционных клонов для каждого клонируемого вируса предполагается создание двух субклональных плазмид, содержащих перекрывающиеся фрагменты генома ВКЭ [Gritsun T.S. и др.,



1998; Hayasaka D. и др., 2004]. После проведения генно-инженерных работ субклоны лигируются в линейную молекулу для воссоздания полноразмерной ДНК-копии ВКЭ *in-vitro*. Данная технология позволяет проводить последующую транскрипцию РНК с помощью SP6 РНК полимеразы с использованием этой копии в качестве матрицы напрямую, т.е. без промежуточного клонирования или очистки длинных фрагментов ДНК в агарозном геле.

Для запланированного нами исследования был создан ряд субклональных плазмид, кодирующих структурную и неструктурную часть штаммов ВКЭ Vs и Нурр, проведен мутагенез соответствующих субклонов (рис. 6-2). В итоге был восстановлен ряд рекомбинантных штаммов ВКЭ (рис. 6-3) на основе генома Нурр IC у которого: а) комплекс структурных генов и 5'НТР заменены на гомологичные гены Vs IC; б) prM и E гены заменены на соответствующие гены Vs IC; в) ген E заменен геном E Vs IC. Аналогичный набор рекомбинантных штаммов был получен на основе генома Vs IC (рис. 6-3). Кроме того, поскольку исходный штамм Нурр обладал делецией гипервариабельного региона внутри 3'НТР [Mandl C.W. и др., 1998], нами также был создан штамм Нурр IC с удлинненным 3'НТР, соответствующим по структуре штаммам E-ВКЭ дикого типа и штамму VsIC. Этот рекомбинант был введен в эксперимент для того, чтобы оценить возможное влияние структуры 3'НТР на биологические свойства и циркуляцию ВКЭ между клещами.

У всех полученных контрольных и рекомбинантных штаммов для подтверждения их идентичности и исключения неспецифичных точечных мутаций была расшифрована первичная нуклеотидная последовательность. Нуклеотидные последовательности соответствовали ожидаемым моделям, неспецифичных аминокислотных замен выявлено не было. Полногеномные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа KP716971 - KP716978.



**Рисунок 6-2. Схематическое изображение промежуточных плазмид (субклонов), использованных для создания рекомбинантных ВКЭ.** Кодированная часть генома и отдельные гены ВКЭ Нург 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. Введенные искусственные сайты рестрикции обозначены многоугольными звездочками (Bsu36I), овалами (MluI), треугольниками (XbaI) и перевернутыми треугольниками (BsiWI). Обозначения субклонов состоят из названия исходного ВКЭ (Vs – инфекционный клон «Васильченко», Нург - инфекционный клон «Нург») и нуклеотидных позиций субклонированного фрагмента генома. Пунктирная линия обозначает короткий линкер вставленный взамен делетированных генов.

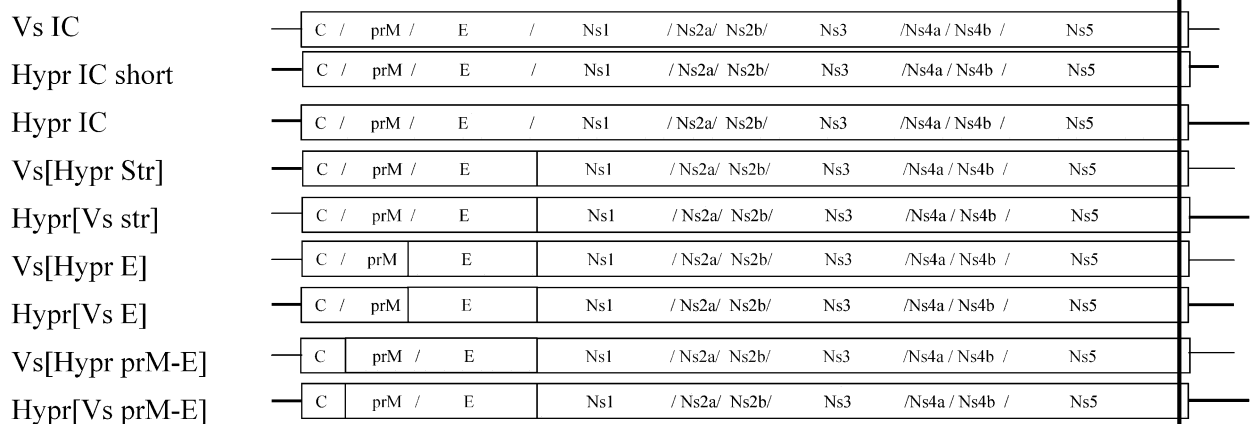
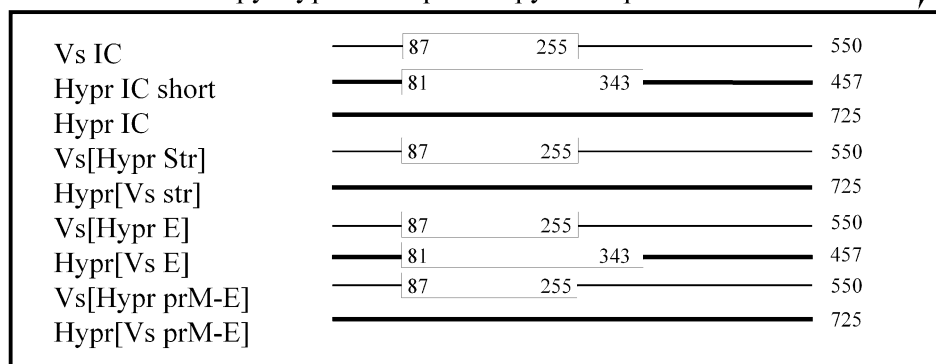


Схема структур 3'-нетранслируемых регионов ВКЭ



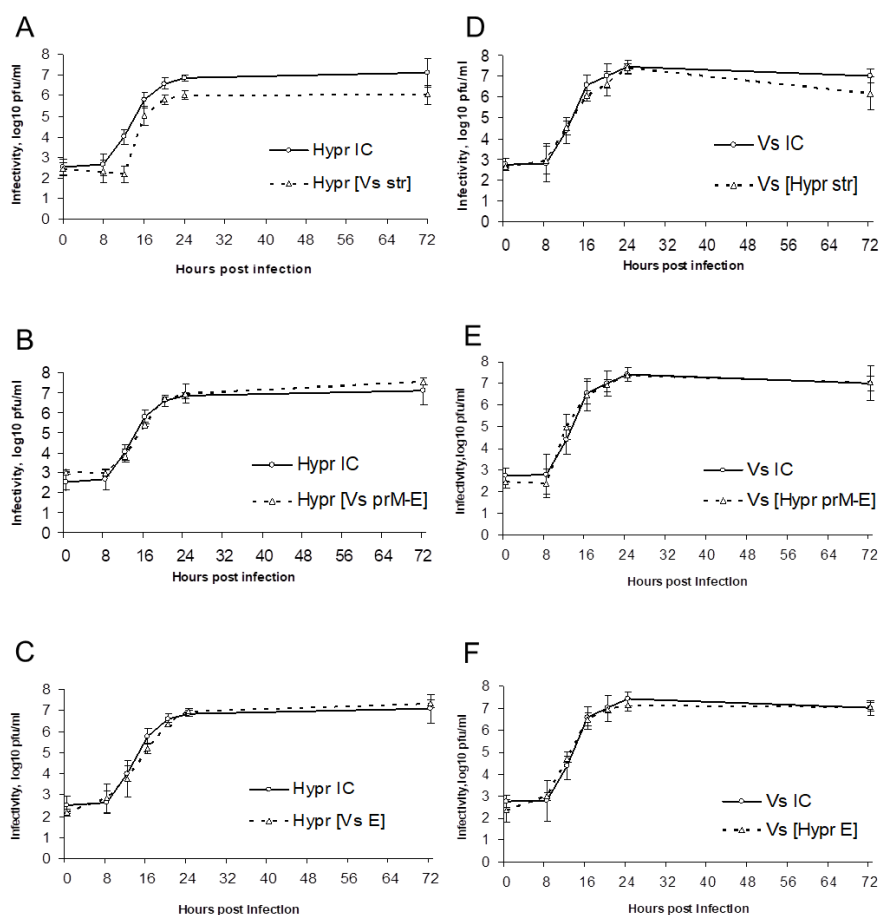
### Рисунок 6-3. Схематическое изображение рекомбинантных ВКЭ.

Кодирующая часть генома и отдельные гены ВКЭ Нург обозначены серыми прямоугольниками с соответствующими обозначениями генов (C- капсидного белка, prM – мембранного, E –оболочечного, Ns1, Ns2a/b, Ns3, Ns4 a/b, Ns5 – гены неструктурных белков). Кодирующая 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, белыми прямоугольникам с цифрами обозначены делеции в 3'НТР, цифры соответствуют нуклеотидным позициям 3'НТР в нумерации генома «Васильченко» (GenBank # L40361).

### 6.3. Сравнительная оценка способности рекомбинантных штаммов ВКЭ к репродукции в культуре клеток млекопитающих

Сравнительная динамика репликации ВКЭ в культуре клеток эмбриона свиньи СПЭВ исследована в течение первых 72 часов после заражения клеточных монослоев с множественностью инфекции 1БОЕ на клетку. Контрольные штаммы Vs IC и Hypr IC не проявляли существенных различий

в динамике репродукции (рис. 6-4). Среди рекомбинантных штаммов на основе Vs IC не выявлено достоверных различий в динамике репродукции в клетках СПЭВ в течение 24ч. после заражения. У штаммов с неспецифичными для СИБ-ВКЭ генами оболочечного белка Е от Е-ВКЭ (Vs [Hyrp E]) концентрация инфекционного вируса в каждой временной точке была идентична контрольным штаммам Vs IC и Hypr IC.



**Рисунок 6-4. Динамика репродукции рекомбинантных ВКЭ в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ.** Монослой клеток заражали соответствующим вирусом с множественностью инфекции 1 БОЕ\ клетку. Отбор проб производили с интервалом 4 часа в течение первых суток, и далее ежедневно до 72 часов после заражения. Эксперимент проводили в 3 независимых повторах. А-С) Рекомбинантные штаммы ВКЭ сконструированные на основе Hypr IC, сплошной линией показан штамм Hypr IC D-F). Рекомбинантные штаммы ВКЭ сконструированные на основе Vs IC, сплошной линией показан штамм Vs IC. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал.

То же самое наблюдалось при замене оболочечного белка Е в комбинации с мембранным ргМ (Vs [Hupr ргМ-Е]) и при замене целого региона 5'НТР-С-ргМ-Е (рис.6-4 D, E, F).

Рекомбинантные штаммы Hupr [Vs ргМ-Е] и Hupr [Vs Е] по репродуктивной динамике в течение 24 ч. после заражения не отличались от контрольных штаммов, а также не различались между собой (рис.6-4 B, C). Это означает, что замена одного белка оболочки Е или его комбинации с мембранным белком ргМ не влияет на репликацию ВКЭ в культуре СПЭВ. Однако замена полноразмерной структурной части генома (включая 5'НТР) на гомологичные гены от СИБ-ВКЭ Vs IC, привела к существенному снижению эффективности репродукции Е-ВКЭ. Действительно, инфекционность Hupr [Vs str] в каждой временной точке была десятикратно ниже, чем у контрольных штаммов и у рекомбинантов Hupr [Vs ргМ-Е] и Hupr [Vs Е] (рис. 6-4 A). Характерно, что белки Е и ргМ-Е СИБ-ВКЭ хорошо совмещались с репликативными структурами Е-ВКЭ - штаммы Hupr [Vs Е] и Hupr [Vs ргМ-Е] репродуцировались на уровне контрольных штаммов. Это наводит на мысль, что замедление репродукции Hupr [Vs str] обусловлено худшим совмещением 5'НТР и капсидного белка С от СИБ-ВКЭ с белками репликативного комплекса Е-ВКЭ. Тем не менее, через 72 ч. после заражения, этот рекомбинант все таки достигал сопоставимых с контрольными штаммами значений 6,5 lg БОЕ/мл.

Через 72 ч. после заражения все штаммы достигали сопоставимых титров. Помимо прочего, оказалось, что делеция ~200 н.о. не оказывает существенного влияния на репродукцию ВКЭ в клетках млекопитающих – контрольные штаммы Е-ВКЭ Hupr IC и Hupr IC short не имели существенных различий ни в динамике репродукции, ни в итоговой концентрации инфекционного вируса через 72 ч. после заражения.

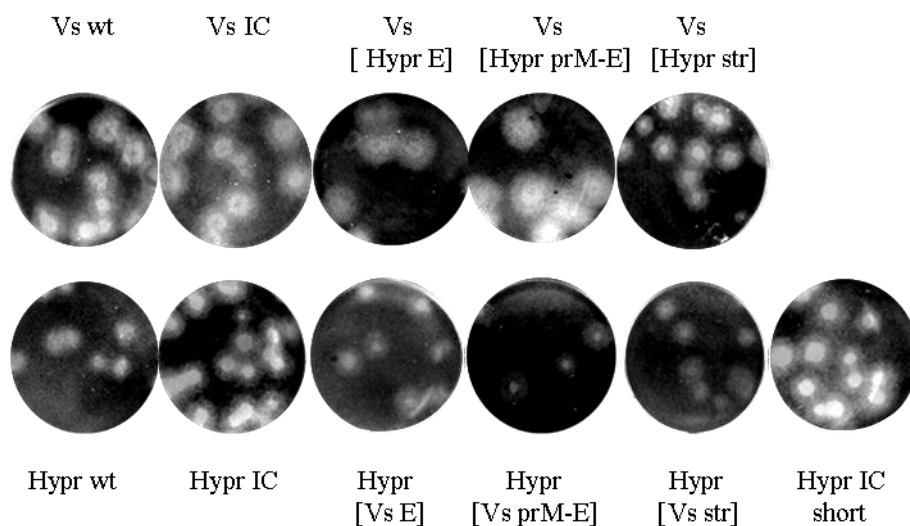
Обобщая полученные результаты можно сделать вывод, что все рекомбинантные штаммы с одинаковой эффективностью размножались в

клетках млекопитающих и не уступали контрольным штаммам ВКЭ ни в скорости репродукции ни в итоговой концентрации инфекционных частиц. Единственным исключением оказался рекомбинантный штамм Нург [Vs str], который обладал несколько сниженной репродуктивной активностью.

#### **6.4. Сравнительная оценка цитопатического действия ВКЭ и морфология бляшек в культуре клеток СПЭВ**

Исходные штаммы Vs и Нург, равно как и их инфекционные клоны Vs IC и Нург IC, различаются по цитопатическому действию (ЦПД) и морфологии бляшек в культуре клеток СПЭВ. Так, для штамма Vs IC через 5 дней инфекции характерны мутные бляшки с размытыми краями диаметром 5-6 мм, тогда как Нург IC продуцирует прозрачные бляшки диаметром 3-4 мм. При оценке ЦПД контрольных штаммов в течение 96 ч. инфекции было установлено, что при заражении Нург IC к этому времени остается  $27,1 \pm 5,3$  % ( $m \pm \alpha$ ) жизнеспособных клеток. При инфицировании Vs IC в идентичных условиях показатели выживаемости клеток СПЭВ были существенно выше и составляли  $49,5 \pm 3,2$  %.

Рекомбинантные штаммы ВКЭ на основе генома СИБ-ВКЭ Vs [Нург E] и Vs [Нург prM-E] формировали бляшки Vs-типа, т.е. крупные и мутные. Внедрение дополнительно гена белка С от Нург IC в геном Vs IC приводило к уменьшению диаметра бляшек, однако они оставались мутными подобно бляшкам исходного штамма Vs IC (рис. 6-5). Такая морфология говорит о том, что способность вируса передаваться между соседними клетками снизилась, при этом его деструктивное воздействие на монослой клеток осталось таким же низким, как и для исходного вируса Vs IC.



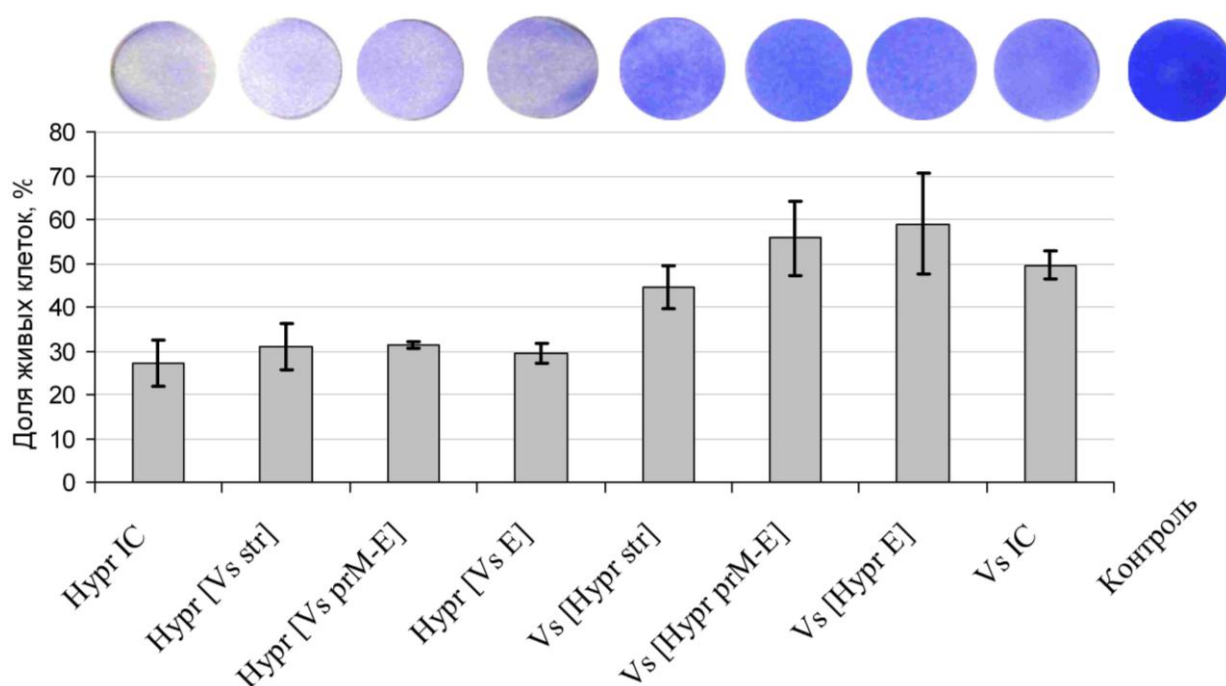
**Рисунок 6-5. Морфология бляшек рекомбинантных ВКЭ в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ через 96 часов после заражения.**

Рекомбинантные штаммы Hypr [Vs E], Hypr [Vs prM-E] и Hypr [Vs str], созданные на основе генома E-ВКЭ, формировали мелкие и прозрачные бляшки, характерные для исходного штамма Hypr IC. В отличие от Vs [Hypr str], присутствие гена С из генома СИБ-ВКЭ Vs IC не оказывало существенного влияния на морфологию рекомбинантного штамма Hypr [Vs str] – формируемые бляшки не отличались от двух других рекомбинантов на основе генома E-ВКЭ ни по размеру, ни по степени разрушения монослоя (рис. 6-5).

Также не было обнаружено различий в морфологии бляшек штаммов Hypr IC и Hypr IC short, что свидетельствует о незначительной роли 3'НТР в формировании цитопатического действия ВКЭ и в распространении ВКЭ между соседними клетками монослоя.

Таким образом, можно констатировать, что размер бляшек ВКЭ в культуре клеток СПЭВ в значительной мере определяется свойствами неструктурной части генома вируса, при этом наблюдается некоторое модифицирующее влияние структурных генов, особенно гена капсидного белка С. Различия в прозрачности бляшек отражают разный уровень ЦПД ВКЭ и полностью определяются составом неструктурной части генома.

Все рекомбинантные штаммы, сконструированные на основе генома Нупр IC, т.е. Нупр [Vs E], Нупр [Vs prM-E] и Нупр [Vs str], разрушали по меньшей 70% клеток СПЭВ в течение 96 ч. инфекции. Это полностью совпадало с показателями исходного вируса Нупр IC (рис. 6-6). Визуальное наблюдение окрашенных монослоев также свидетельствует об униформности цитопатического действия всех рекомбинантных ВКЭ на основе генома E-ВКЭ Нупр IC (рис. 6-6).



**Рисунок 6-6. Цитопатическое действие рекомбинантных ВКЭ на культуру клеток СПЭВ.** Монослой клеток СПЭВ в лунках 24-луночной планшеты заражали соответствующим вирусом (указан по оси абсцисс) с множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку. Через 96 ч. после заражения клетки фиксировали формалином, окрашивали кристаллическим фиолетовым и высушивали. Для оценки количества жизнеспособных клеток, каждую лунку экстрагировали метанолом и измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 590 нм. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение оптической плотности экстрактов инфицированных монослоев к оптической плотности лунок с незараженными клетками (лунка «Контроль») и выражали в процентах. Сверху приведены фотографии окрашенных монослоев в соответствующих лунках. Каждый тест проводился в 4 независимых повторах, на диаграмме отражены средние значения с указанием 95% доверительного интервала.

ЦПД всех рекомбинантных ВКЭ на основе генома СИБ-ВКЭ было сопоставимо с действием контрольного штамма Vs IC. Однако, в отличие от



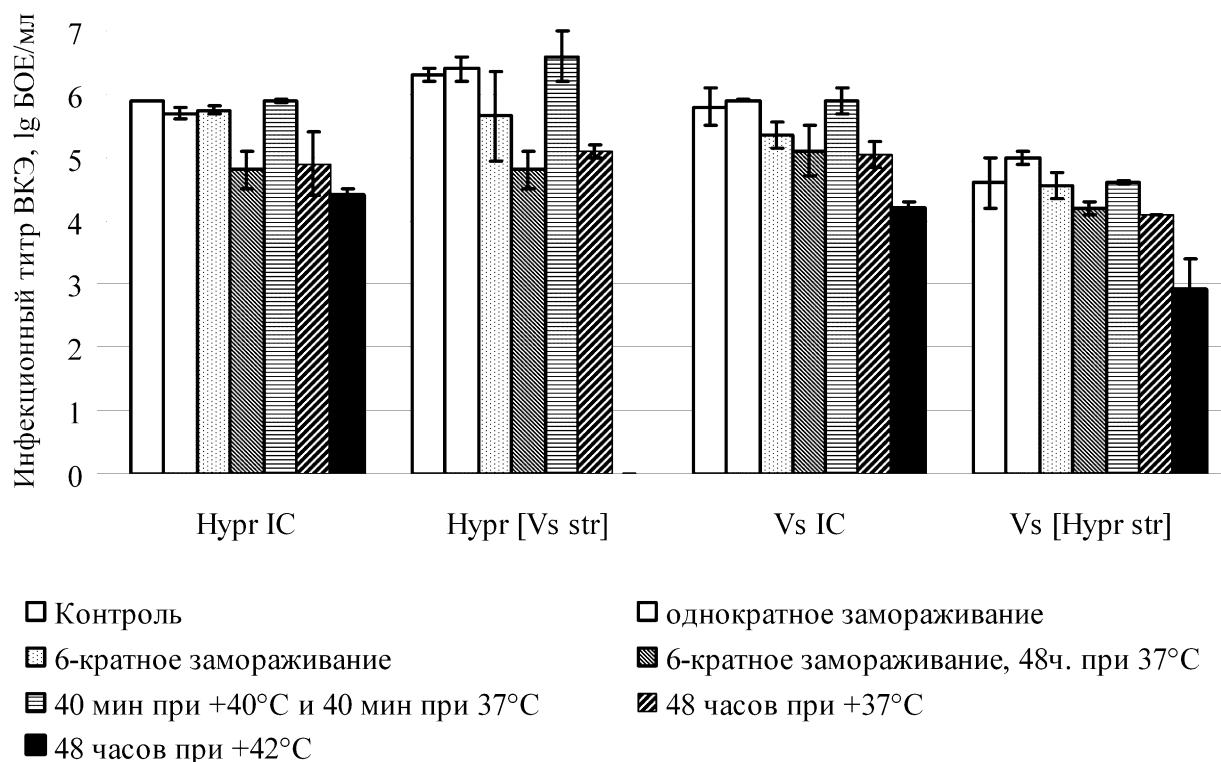
вирусов на основе Нург IC, наблюдался более широкий полиморфизм выживаемости клеток СПЭВ поскольку количество погибших клеток варьировало от 30 до 55 % в зависимости от генетической модификации структурной части генома вируса. Наиболее цитодеструктивным оказался штамм Vs [Нург str] у которого 5'НТР, С, ргМ и Е гены целиком были заменены на гомологичный фрагмент генома Нург IC. Наименьшую патогенность для клеток СПЭВ проявляли штаммы Vs [Нург Е] и Vs [Нург ргМ-Е] у которых были заменены только гены Е и ргМ-Е соответственно (рис. 6-6). Впрочем, статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ) наблюдались только между группами вирусов на основе генома Нург IC и вирусов на основе генома Vs. Различия между вирусами внутри одной группы были недостоверны. В итоге, можно предположить, что ЦПД ВКЭ в культуре клеток СПЭВ практически полностью определяется свойствами комплекса неструктурных генов.

#### **6.5. Сравнительная оценка физической стабильности вирионов рекомбинантных и контрольных штаммов ВКЭ**

Ранее было высказано предположение о том, что вирионы штамма «Васильченко» менее устойчивы к воздействию физических факторов, чем вирионы других типовых штаммов ВКЭ [Gritsun T.S. и др., 1993]. Кроме того, замедленная кривая роста рекомбинантного штамма Нург [Vs str] позволяет предположить, что стабильность его вирионов также понижена за счет низкой специфичности взаимодействия геномной РНК Е-ВКЭ (Нург IC) со структурными белками СИБ-ВКЭ (Vs IC). Эти факторы могли серьезно повлиять на результаты экспериментов, поскольку титр нестабильного вируса способен самопроизвольно снижаться просто в результате физического воздействия экспериментальных процедур, например, при заморозке стоков вируса, инкубации зараженных культур клеток при 37°C, подготовке аликвот для заражения и заражении клещей и лабораторных

мышей и т.п. Для оценки повреждающего воздействия экспериментальных процедур на вирионы ВКЭ, мы сравнили стабильность контрольных штаммов Vs IC и Нур IC а также рекомбинантных штаммов Vs [Нур str] и Нур [Vs str] в более жестких физических условиях, чем те, которые обычно характерны для вирусологических экспериментов (детали см. в гл. 3 «Материалы и методы»).

Однократный цикл замораживания-оттаивания никак не повлиял на инфекционность ВКЭ вне зависимости от генетической структуры вируса (рис. 6-7). Шестикратное повторение цикла замораживание-оттаивание приводило к существенному снижению инфекционности рекомбинантного штамма Нур [Vs str] на 0,5-0,8 lg БОЕ\мл ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, отмечалась тенденция к снижению титра контрольного штамма Vs IC, однако различия не были статистически достоверны. Инфекционность Нур IC и Vs [Нур str] не изменялась. После шестикратной заморозки с последующей инкубацией в течение 48 часов при 37°C у всех исследуемых вирусов вне зависимости от генетической структуры инфекционность достоверно снижалась примерно на 90%. То же самое происходило при простой инкубации при 37°C в течение 48 часов, что говорит о минимальном повреждающем эффекте 6 циклов замораживания-оттаивания. Все вирусы вне зависимости от генетической структуры полностью сохраняли инфекционные титры при кратковременном повышении окружающей температуры до 37° - 40°C (инкубация при 37°C в течение 40 мин. с последующей инкубацией при 40°C в течение дополнительных 40 мин). Однако инкубация при 42°C в течение 2 дней приводила к драматическому снижению титров в 50-100 раз у всех штаммов, а рекомбинант Нур [Vs str] в этих условиях полностью утратил инфекционность (рис. 6-7).



**Рисунок 6-7. Стабильность вирионов ВКЭ при воздействии различных физических факторов.** Идентичные аликвоты соответствующих штаммов ВКЭ (указаны по оси абсцисс) подвергали воздействию физических условий, имитирующих экспериментальные или более экстремальные: «контроль» – аликвота исходного стока ВКЭ, хранившаяся при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение всего эксперимента; «однократное замораживание» - аликвоту ВКЭ оттаивали при комнатной температуре и повторно замораживали; «6-кратное замораживание» - цикл замораживание-оттаивание повторяли 6 раз; «6-кратное замораживание, 48ч. при  $37^{\circ}\text{C}$ » - аликвоту ВКЭ после 6 циклов замораживание-оттаивание инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч.; «40 мин при  $+40^{\circ}\text{C}$  и 40 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ » - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 40 мин при  $+40^{\circ}\text{C}$  и затем 40 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ ; «48 часов при  $+37^{\circ}\text{C}$ » - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 48 ч. при  $37^{\circ}\text{C}$ ; «48 часов при  $+42^{\circ}\text{C}$ » - аликвоту ВКЭ инкубировали в течение 48 ч. при  $42^{\circ}\text{C}$ . После этого определяли инфекционность ВКЭ в каждой аликвоте. Эксперимент проводили в 3 независимых повторах. На диаграмме приведены средние значения с указанием 95% доверительного интервала.

Таким образом, все контрольные и рекомбинантные вирусы были стабильны при стандартных условиях проведения экспериментов, успешно переносили замораживание-оттаивание и повышение температуры до  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 1-1,5 ч., что достаточно для проведения технических манипуляций. Однако в экстремальных условиях все ВКЭ снижали инфекционность, при этом наименее устойчивым оказался штамм Hypr [Vs str] что указывает на некоторое нарушение целостности вирионов.

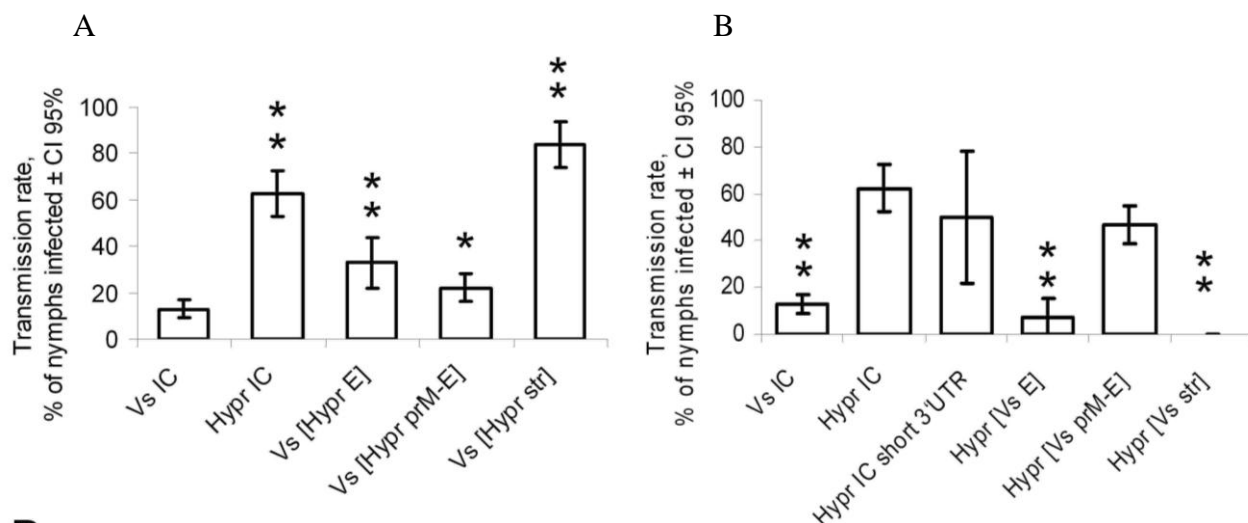
## **6.6. Сравнительное исследование эффективности неvirемической трансмиссии рекомбинантных штаммов ВКЭ между клещами *I. ricinus***

Эффективность неvirемической трансмиссии (ЭТ) рассчитывали как долю зараженных нимф после совместного питания 15 незараженных нимф и 2 инфицированных ВКЭ самок *I. ricinus* (детали приведены в гл. 3 «Материалы и методы»). Наблюдались высокодостоверные различия ( $p < 0,01$ ) в ЭТ между контрольными штаммами Нурр IC (62,5 %) и Vs IC (13 %), что соответствовало ранее наблюдаемым различиям в ЭТ штаммов Vs и Нурр дикого типа.

Наиболее замечательным результатом оказалась повышенная до 84 % ЭТ рекомбинантного ВКЭ Vs [Нурр str]. Этот показатель был существенно выше, чем ЭТ любого другого ВКЭ в нашем наборе, включая контрольный Е-ВКЭ Нурр IC. Характерно, что комплементарный штамм Нурр [Vs str] полностью потерял способность передаваться между клещами *I. ricinus* (рис. 6-8). Очевидно, что эффективная несистемная трансмиссия ВКЭ между клещами *I. ricinus* полностью определяется свойствами структурных белков С, ргМ и Е.

На следующем этапе мы проверили ЭТ рекомбинантных ВКЭ, с заменой генов Е и ргМ-Е чтобы оценить вклад каждого структурного гена в обеспечение эффективной циркуляции ВКЭ между клещами. При замене гена Е у Нурр IC гомологичным геном Vs IC происходит существенное снижение ЭТ с 62,5 % до 7 % (Нурр [Vs Е], рис. 6-8), что указывает на критическую роль оболочечного белка Е в адаптации ВКЭ к передаче между клещами *I. ricinus*. Замена ргМ-Е на неспецифичный фрагмент также привела к снижению ЭТ, хотя и в гораздо меньших масштабах – до 47 % (рис. 6-8 В). Вероятнее всего, это обусловлено биологической ролью белка ргМ. Он является шапероном для корректного складывания белка Е внутри клетки хозяина и обеспечивает эффективное формирование оболочки вириона [Stadler K. и др., 1997]. Наличие соответствующих друг другу белков ргМ и Е может существенно увеличить эффективность репликации вируса даже в том

случае если эти белки не оптимально адаптированы к организму клеща-хозяина.



**Рисунок 6-8. 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 Hypr 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.

Рекомбинантные СИБ-ВКЭ на основе генома Vs IC и содержащие ген E (Vs [Hypr E]) или prM-E (Vs [Hypr prM-E]) 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 Hypr IC отдельными структурными генами Vs IC, они были высоко достоверны (рис. 6-8 А).

В совокупности полученные данные доказывают регуляторную роль белка E в процессе неvirемической трансмиссии ВКЭ между клещами *I. ricinus*. Однако, необходимо отметить, что как активирующий, так и подавляющий эффект белка E, изолированного или в сопровождении prM, несравним по масштабу с изменениями, вызываемыми заменой комплекса структурных генов целиком. Так, совокупное увеличение ЭТ, вызванное заменой E и prM в Vs IC на гомологичные гены Hypr IC составило порядка 10%, тогда как замена фрагмента генома 5'НТР-С-prM-E 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.

Сравнительная оценка ЭТ штаммов Нурр IC и Нурр IC short показала, что эти вирусы не отличаются друг от друга и имеют показатели трансмиссии, сопоставимые с таковыми штамма Нурр дикого типа (рис. 6-8). Это в очередной раз подтверждает малозначимую роль неструктурных белков и 3'НТР в обеспечении неvirемической трансмиссии ВКЭ.

#### **6.7. Сравнительная оценка эффективности репродукции рекомбинантных штаммов в самках и в нимфах *I. ricinus***

Концентрацию инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок *I. ricinus* определяли по завершении совместного питания с незараженными нимфами. Этот показатель отображал накопление ВКЭ в слюнных железах как в течение 14 дней инкубации зараженных клещей перед присадкой для питания, так и в течение 3 дней питания на лабораторных мышах.

Концентрация инфекционного вируса достоверно отличалась у контрольных штаммов Vs IC (~ 3,5 lg БОЕ/мл) и Нурр IC (~ 4,5 lg БОЕ/мл) и соответствовала различиям в ЭТ этих вирусов (рис. 6-9 и 6-8 соответственно).

Наибольший инфекционный титр в самках *I. ricinus* был отмечен для рекомбинантного штамма Vs [Нурр str] (~ 5 lg БОЕ/мл.), что хорошо согласовывалось с высокой ЭТ этого вируса. Введение Е и prМ-Е генов от Нурр 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. 6-9 А).

Замена региона 5'НТР-С-prM-E в Нупр IC на гомологичный фрагмент генома Vs IC привело примерно к стократному снижению способности рекомбинантного штамма Нупр [Vs str] размножаться в слюнных железах клещей *I. ricinus*. Так, средний титр Нупр IC составлял ~ 4,5 lg БОЕ/мл, тогда как инфекционность рекомбинантного штамма Нупр [Vs str] достигала порядка 2,5 lg БОЕ/мл (рис. 6-9 В). Учитывая, что инфицирующая доза ВКЭ при заражении самок составляла 2,7 lg БОЕ/мл (500 БОЕ), можно сделать вывод о том, что способность Нупр [Vs str] к репродукции в самках *I. ricinus* крайне ограничена. Замена отдельных генов E и prM-E в Нупр 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-prM-E. Из этих двух штаммов, статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) наблюдались только между Нупр IC (~ 4,5 lg БОЕ/мл) и Нупр [Vs E] (~ 3,5 БОЕ/мл).

Замена длинного 3'НТР на короткий у вируса Нупр IC привела к снижению титров ВКЭ Нупр IC short в самках клещей, хотя различия с контрольным вирусом Нупр IC были статистически не достоверны ( $p > 0,05$ ). Средние титры в самках *I. ricinus* для Нупр IC и Нупр IC short составляли 4,5 и 4 lg БОЕ/мл. соответственно (рис. 6-9 В).

Таким образом, различия в концентрации инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок *I. ricinus* между контрольными СИБ-ВКЭ Vs IC и E-ВКЭ Нупр IC не превышали 1 lg БОЕ/мл. Рекомбинантные штаммы также в большинстве своем незначительно отличались от контрольных вирусов и друг от друга по способности репродуцироваться в самках клещей. Исключение составили ВКЭ с модифицированным фрагментом генома, включающем 5'НТР и три структурных гена чужеродного вируса. Введение этого фрагмента из генома E-ВКЭ в геном СИБ-ВКЭ приводило к 50-кратному возрастанию титров вируса в слюнных железах клещей. Обратный процесс замены комплекса структурных генов в геноме E-ВКЭ на

соответствующие гены СИБ-ВКЭ приводило к 100-кратному снижению концентрации инфекционного вируса. На основании полученных данным можно заключить, что изменения в концентрации инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок клещей, во-первых, обусловлены наличием комплекса специфичных структурных генов С-prM-E (вкуче с 5'НТР) и, во-вторых, приводят к аналогичным изменениям в ЭТ ВКЭ от самок к незараженным нимфам. Замена одиночных генов E и prM-E значительно меньше влияет как на репродукцию ВКЭ в слюнных железах взрослых клещей, так и на ЭТ между клещами.

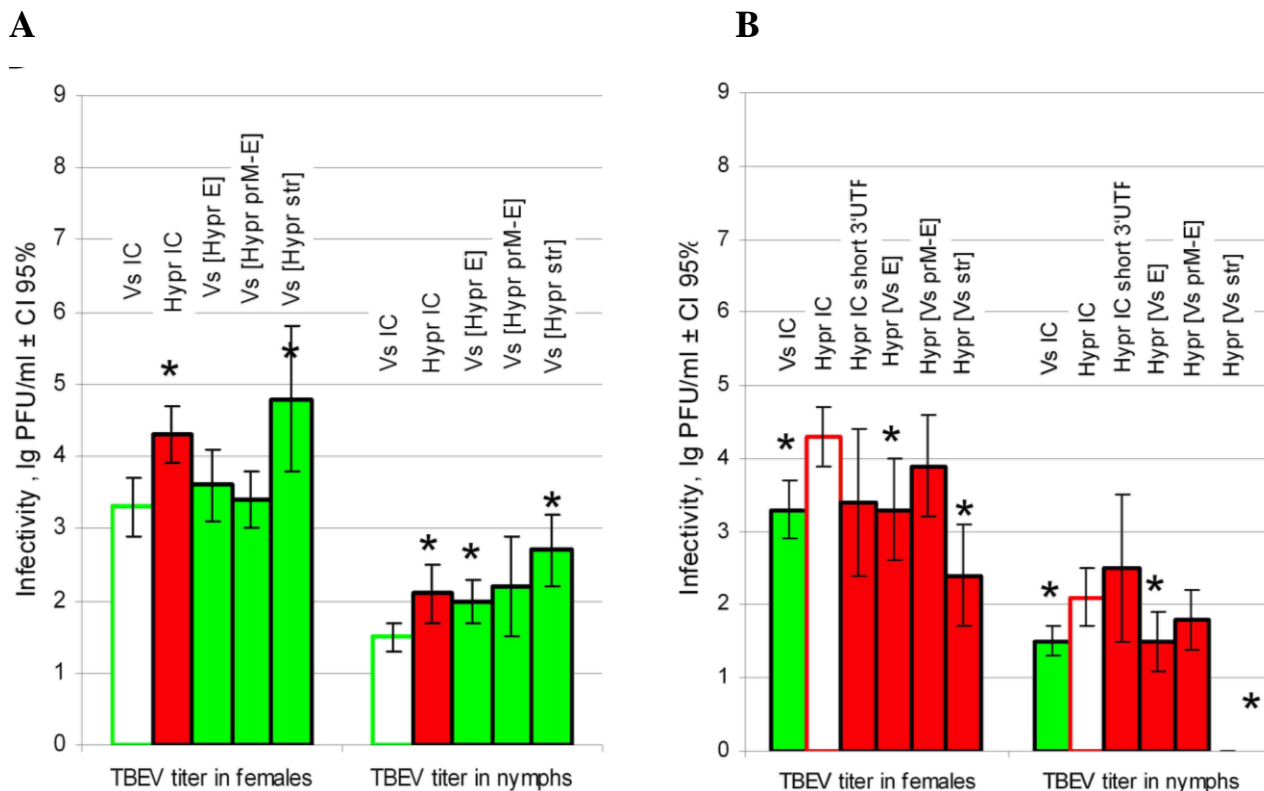
Для того, чтобы оценить способность разных рекомбинантных штаммов ВКЭ оккупировать нового хозяина мы определили титры инфекционного вируса в нимфах-реципиентах после окончания совместного питания с зараженными самками. Этот показатель отражал только накопление ВКЭ в организме клеща в течение 3 дней совместного питания с зараженными самками.

Концентрация контрольного штамма Нурр IC в нимфах составляла в среднем 2 lg БОЕ/мл. Для вируса Vs IC были характерны меньшие показатели инфекционности в нимфах *I. ricinus* – в среднем 1,5 lg БОЕ/мл, причем отличия от Нурр IC были существенны ( $p < 0,05$ , t-тест Стьюдента).

В целом репродукция ВКЭ в нимфах коррелировала с репродукцией во взрослых клещах (рис. 6-9). Так, вирус Vs [Нурр str] также достигал наивысших среди всех исследованных штаммов показателей – его концентрация в среднем составляла порядка 2,5 lg БОЕ/мл. Другие рекомбинантные штаммы на основе генома Vs IC также показывали улучшение способности к репродукции в нимфах *I. ricinus* – и Vs [Нурр E] и Vs [Нурр prM-E] достигали более высоких титров, чем контрольный штамм Vs IC, причем для Vs [Нурр E] различия были высоко достоверны ( $p < 0,05$ , рис. 6-9 А). Штамм Нурр [Vs str], естественно, проявил наихудшую способность к репликации в нимфах поскольку не было обнаружено ни одной зараженной нимфы. В связи с этим появляется вопрос, что явилось



биологической причиной блокировки неvirемической трансмиссии Hypr [Vs str]? С одной стороны, низкая способность этого штамма реплицироваться в слюнных железах самок, может не обеспечивать создания минимальной инфицирующей концентрации ВКЭ в слюне клещей.



**Рисунок 6-9. Концентрация инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок и в нимфах *I. ricinus*.** Каждая самка была заражена инъекцией 500 БОЕ соответствующего штамма ВКЭ (обозначен над каждой точкой данных). Через 14 дней самок прокармливали на белых мышах совместно с незараженными нимфами *I. ricinus*. Период кормления продолжался 3 дня, после чего определяли титр инфекционного ВКЭ в слюнных железах самок и в теле нимф. Каждый эксперимент воспроизводили в 4 или более независимых повторах. 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 Hypr IC. Штаммы, содержащие неструктурные гены Hypr, а также контрольный штамм Hypr 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.

С другой стороны, блокировка трансмиссии может быть вызвана неспособностью Hypr [Vs str] заражать клетки клещей на нимфальной стадии развития. Концентрация инфекционного вируса у рекомбинантных штаммов

Нур [Vs E] и Нур [Vs prM-E] в нимфах также была понижена по сравнению с контрольным штаммом Нур IC. Интересно, что достоверность различий, также как и в самках, была высокой ( $p < 0,05$ ) для Нур [Vs E], но не для штамма Нур [Vs prM-E], который достигал более высоких титров - 1,5 и 1,8 lg БОЕ/мл соответственно (рис. 6-9 В). В отличие от репродукции в самках, в нимфах штамм Нур IC short достигал заметно более высоких значений среднего титра, чем контрольный Нур IC (2,5 против 2,1 lg БОЕ/мл соответственно). Это может быть следствием стимулирующего эффекта, который короткий 3'НТР оказывает на репродукцию ВКЭ в нимфах клещей, однако вариабельность результатов была очень большой, достоверность наблюдаемых отличий низкая ( $p > 0,05$ ) поэтому подобный вывод требует дополнительного подтверждения.

#### **6.8. Оценка способности рекомбинантных штаммов ВКЭ инфицировать лабораторных мышей и их патогенные свойства.**

Все рекомбинантные вирусы были способны инфицировать лабораторных белых мышей через укусы инфицированных клещей и обладали выраженными патогенными свойствами. Основные патогенетические показатели для каждого исследованного штамма приведены в таблице 6-1. Кроме того, для каждого штамма была вероятность выживания в каждый день после заражения по методу Каплана-Мейера и проанализирована динамика выживаемости (рис. 6-10).

Контрольные штаммы Нур IC и Vs IC отличались по уровню смертности и среднее продолжительности жизни (СПЖ), причем Нур IC был более патогенным для белых мышей, чем Vs IC (табл. 6-1). Также заметны существенные различия в динамике выживаемости мышей (рис. 6-10 А). Так, для штамма Нур IC была характерна 100 % смертность, СПЖ составляла 10 дней а кривая выживаемости отражала резкое падение вероятности выживания начиная с 7 дня, причем вероятность выживания мыши на 11 день

после заражения была нулевой. Для штамма Vs IC смертность составляла 85%, СПЖ была 15 дней, а кривая выживаемости имела пологий вид с плавным снижением вероятности выживания между 9 и 13 днем после заражения и более резким падением между 14 и 16 днями после заражения. Начиная с 17 дня, вероятность выживания оставалась неизменной и составляла примерно 15 % (рис. 6-10 А).

**Таблица 6-1.** Патогенность рекомбинантных и контрольных штаммов ВКЭ для лабораторных белых мышей (линия Balb/C)

Штамм	Смертность, %	Средняя продолжительность жизни, дней
Vs IC	85	15
Hypr IC	100	10
Hypr IC short	87,5	20
Hypr [Vs E]	75	14
Hypr [Vs prM-E]	100	9
Hypr [Vs str]	<b>29</b>	>21
Vs [Hypr E]	<b>39,5</b>	>21
Vs [Hypr prM-E]	75	20
Vs [Hypr str]	100	9

Патогенные свойства рекомбинантных штаммов варьировали в широких пределах. Достоверные отличия ( $p < 0,01$ ) в уровне смертности по сравнению с контрольными вирусами были обнаружены у двух рекомбинантных штаммов – Vs [Hypr E] и Hypr [Vs str]. Оба этих штамма имели пониженную смертность (табл. 6-1, рис. 6-10 В). Также эти два штамма были единственными, у которых СПЖ превышала продолжительность периода наблюдений (табл. 6-1).

При анализе динамики выживаемости видно, что рекомбинантные штаммы на основе генома Vs IC разбились на 2 группы. Профиль кривой вероятности выживания штамма Vs [Hypr str] был практически идентичен

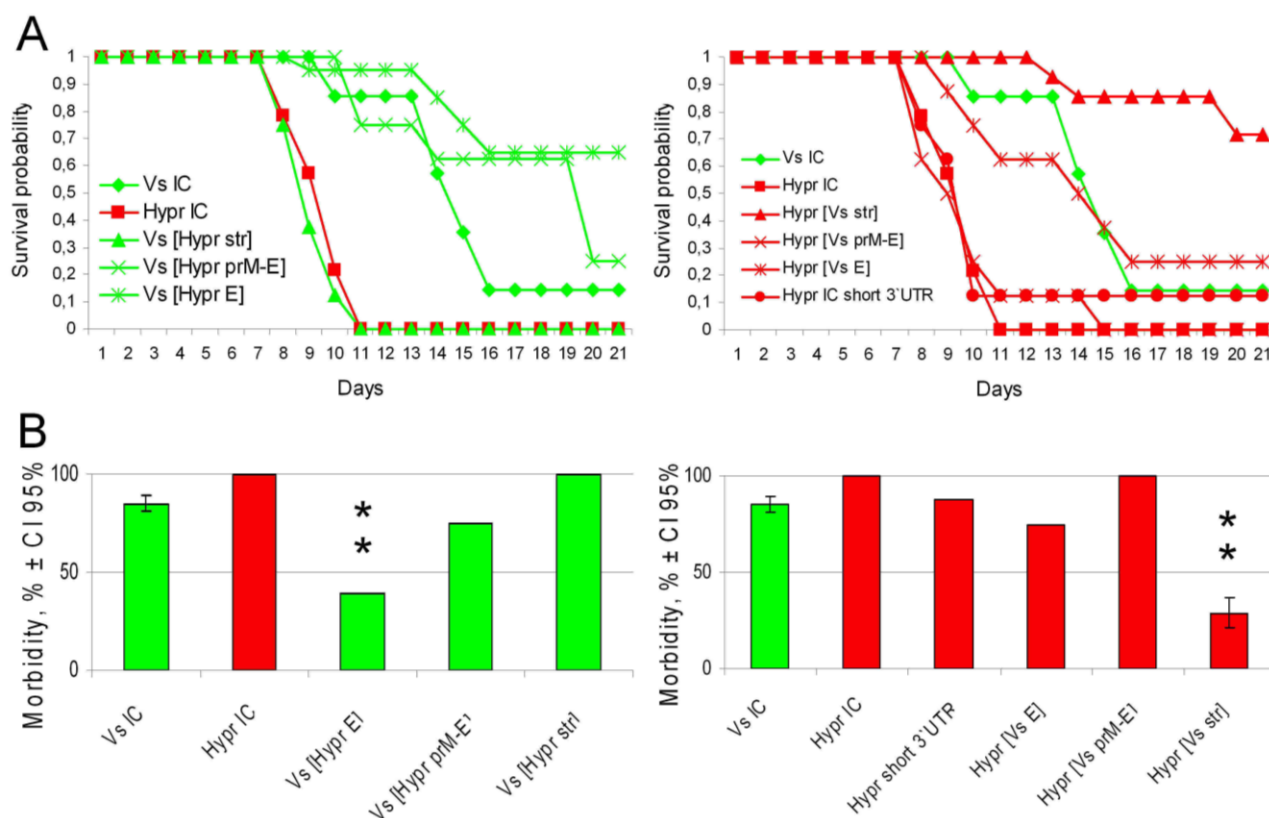
профилю контрольного штамма Нупр IC (рис. 6-10 А). Соответственно, данный штамм вызывал 100 % гибель животных, а СПЖ была даже меньше чем при заражении Нупр IC и составляла 9 дней. При этом профиль выживаемости штаммов Vs [Нупр E] и Vs [Нупр prM-E] созданных, как и Vs [Нупр str], на основе генома Vs IC, был подобен профилю Vs IC с плавным снижением вероятности выживания между 10 и 20 днем после заражения. СПЖ мышей при заражении этим вирусом также была сравнима с Vs IC, составляя 15 и 19 дней соответственно. Смертность при заражении Vs [Нупр prM-E] не изменялась, а при заражении Vs [Нупр E] отмечалось достоверное снижение смертности до 39,5 % ( $p < 0,01$ ).

Рекомбинанты на основе генома Нупр IC проявляли даже большее разнообразие патогенетических свойств, чем предыдущая группа. При замене полноразмерного кластера структурных генов Нупр IC генами от Vs IC наблюдалось значительная аттенуация итогового штамма Нупр [Vs str]. Смертность достоверно снижалась до рекордно низкого показателя 29 % ( $p < 0,01$ ), СПЖ возрастала до 21 дня и более (табл. 6-1, рис. 6-10В). Кривая выживаемости имела экстремально пологий вид без резких падений в результате чего, вероятность выживания мышей через 21 день инфекции, при заражении вирусом Нупр [Vs str], составила 70 % (рис. 6-10 А).

Замена белка E также приводила к снижению патогенности вируса, хотя и в существенно меньшем масштабе, в целом этот вирус был скорее подобен Vs IC. Так, хотя смертность и снизилась до 75 %, однако наблюдаемые различия не были статистически достоверны ( $p = 0,1$ ). СПЖ составляла 14 дней, что также сопоставимо с показателями Vs IC. Кривая выживаемости напоминала профиль кривой Vs IC, однако снижение вероятности выживания начиналось раньше, чем у Vs IC. Общий профиль был более пологим и начиная с 16 дня после заражения вероятность выживания оставалась неизменной на уровне 25 % (рис. 6-10 А).

Замена комплекса белков prM-E не оказывала никакого воздействия на патогенетические свойства Нупр [Vs prM-E]. Смертность равная 100%, СПЖ

продолжительностью 9 дней, резкое падение вероятности выживания в период с 7 по 11 день, нулевая вероятность выживания мышей на 15 день после заражения - этот вирус определенно проявлял признаки высокой вирулентности, характерной для Hypr IC.



**Рисунок 6-10. Патогенность рекомбинантных и контрольных штаммов ВКЭ для белых мышей Balb/C.** А) Вероятность выживания мышей в течение 21 дня после заражения через укус клеща. Расчет производили по методу Каплана-Мейера с использованием программ Statistica 6.1 и MS Office EXCEL. Зелеными линиями обозначены рекомбинантные штаммы на основе генома Vs IC и контрольный штамм Vs IC. Красными линиями обозначены рекомбинантные штаммы на основе генома Hypr IC и контрольный штамм Hypr IC. Б) Показатели смертности среди заболевших мышей. Показаны средние значения доли погибших животных среди инфицированных. Планки погрешностей отражают 95 % доверительный интервал. Достоверность различий между долями оценивали с помощью t-критерия, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Двумя звездочками обозначены высоко достоверные отличия ( $p < 0,01$ ).

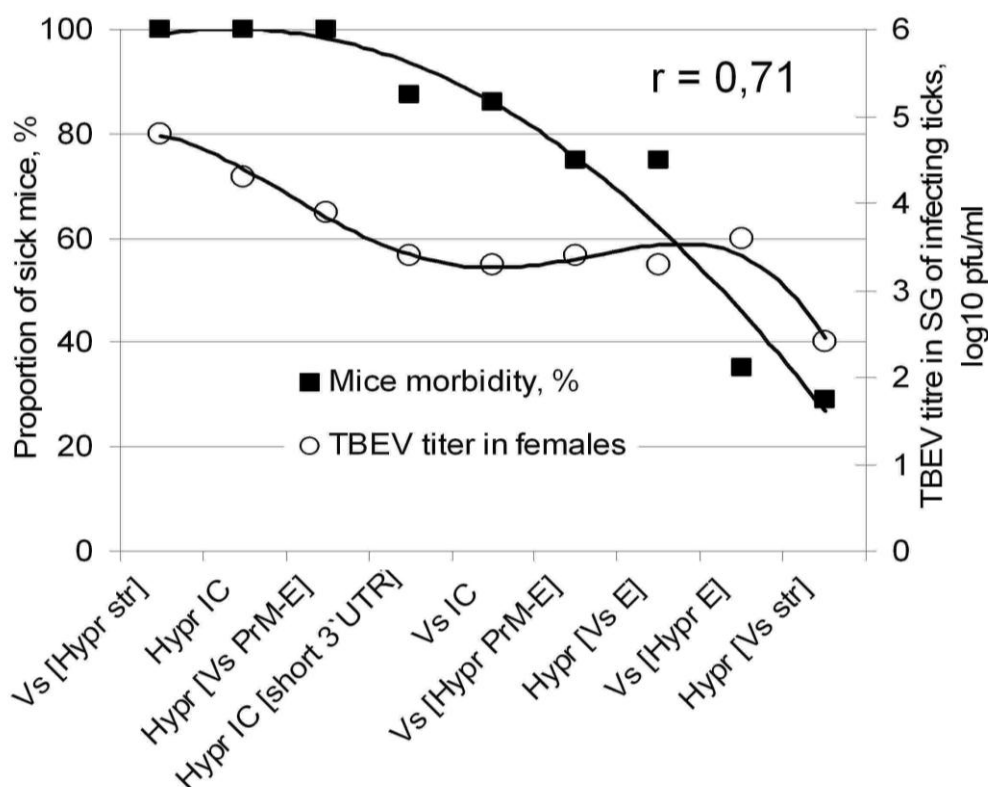
Таким образом, структурные гены играют важную роль в формировании патогенных свойств ВКЭ. Наибольший эффект достигался при замене полноразмерных кластеров структурных генов, включающих 5'НТР, С, ргМ и Е гены – ВКЭ полностью изменял свою вирулентность и

приобретал все характеристики штамма-донора структурной части генома. Замена белка E в случае Hypr [Vs E] приводила к заметной аттенуации ВКЭ, а в случае Vs [Hypr E] также изменяла патогенность вируса в сторону снижения его патогенности. При добавлении в рекомбинантный вирус гена prM происходило частичное (Vs [Hypr prM-E]) или полное (Hypr [Vs prM-E]) восстановление исходных патогенных свойств, характерных для соответствующего контрольного штамма (Vs IC и Hypr IC соответственно). Таким образом, аттенуирующее воздействие чужеродного белка E, по всей вероятности, обусловлено его неполным соответствием шаперону prM [Stadler K., 1997], нарушением процесса созревания вириона и, следовательно, формированием неполноценной в патогенетическом плане популяции вируса. Подтверждением этого вывода служит то, что патогенность ВКЭ полностью восстанавливается при внедрении в геном штамма-реципиента вместе с донорским геном E также донорского гена prM.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что патогенетические свойства ВКЭ определяются либо структурой 5'НТР и/или гена С ВКЭ, либо совокупными свойствами вириона включая оболочечный белок, (пре)мембранный белок и капсид.

Поскольку заражение мышей проводили естественным способом, т.е. через укус клеща, точный контроль заражающей дозы был невозможен, поскольку не был известен ни точный объем введенной клещом слюны, ни концентрация ВКЭ в секрете слюнных желез. Поэтому мы проанализировали зависимость патогенетических свойств ВКЭ от концентрации инфекционного вируса в слюнных железах клещей *I. ricinus* (рис. 6-11). Оказалось, что различия в титрах инфекционного вируса положительно коррелировали с показателями смертности инфицированных мышей ( $R = 0,73$ ), однако корреляция не была строго линейной. Так, несмотря на то, что инфекционный титр штаммов Hypr IC, Vs [Hypr str] и Hypr [Vs prM-E] в клещах различался в 10-15 раз, все они вызывали 100% гибель зараженных мышей, а средняя продолжительность жизни животных не превышала 10

дней. В то же время, штамм Vs [Hypr E] при сопоставимых титрах в клещах (порядка 3.5 lg БОЕ/мл) обладал пониженной патогенностью – смертность среди мышей 39,5%, СПЖ более 21 дня. Рекомбинантные штаммы Hypr IC short, Vs IC, Vs[Hypr prM-E] и Hypr[Vs E] развивали практически одинаковые титры в клещах (3-3,5 lg БОЕ/мл) однако различались по профилю выживаемости, СПЖ и смертности инфицированных мышей (рис. 6-10, 6-11).



**Рисунок 6-11. Корреляция между показателями смертности зараженных мышей и концентрацией инфекционного ВКЭ в слюнных железах клещей *I. ricinus*.** Линии аппроксимации построены на основе полиномиального метода 4 порядка с помощью программы MS Office EXCEL. Значение (R) в правом верхнем углу графика отражает коэффициент корреляции Пирсона между наборами данных по смертности мышей (черные квадраты, левая шкала ординат) и инфекционности ВКЭ в слюнных железах *I. ricinus*, использовавшихся для заражения через укус (белые окружности, правая шкала).

Эти результаты означают, что различия в патогенности рекомбинантных штаммов ВКЭ для мышей были действительно 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.

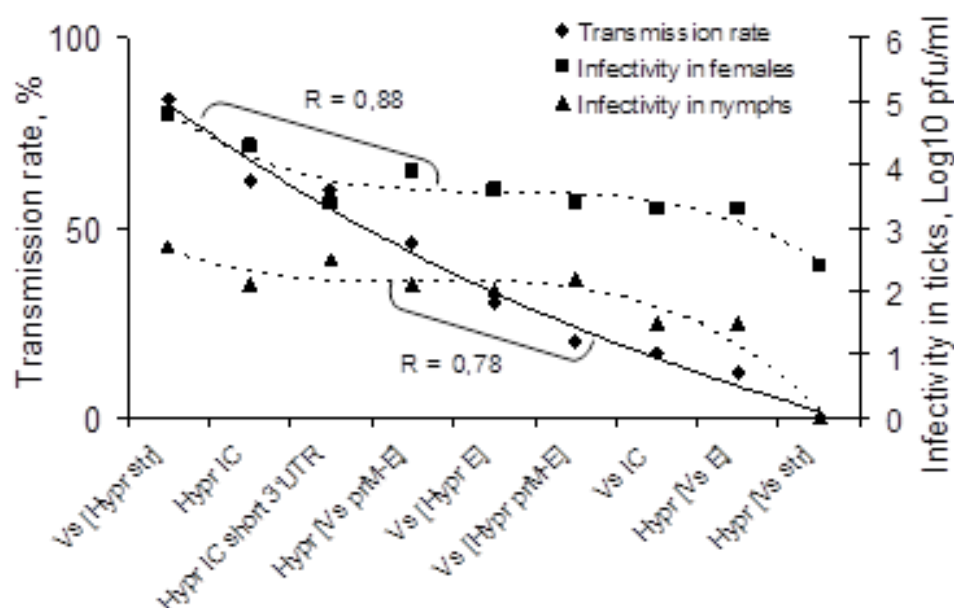
#### **6.9. Ассоциации между структурой генома ВКЭ, репликацией вируса в слюнных железах клещей и эффективностью невинермической трансмиссии между *I. ricinus*.**

Для того чтобы установить, чем обусловлены наблюдаемые изменения в ЭТ, мы применили три независимых подхода регрессионного и корреляционного анализа. Во-первых, была проанализирована корреляция между ЭТ и титрами ВКЭ с разной генетической структурой в слюнных железах самок и нимф *I. ricinus*; во-вторых, проведен регрессионный анализ взаимосвязей между ЭТ и изменениями в геноме ВКЭ; и в-третьих, проведен регрессионный анализ взаимосвязей между ЭТ и аминокислотной структурой полипротеина контрольных и рекомбинантных ВКЭ. При ранжировании вирусов в порядке уменьшения ЭТ, прослеживаются тесные ассоциации между ЭТ, титром ВКЭ в слюнных железах клещей и структурой генома ВКЭ (рис. 6-12). 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. 6-12).

При сравнении показателей ЭТ и соответствующих генетических модификаций в геномах Vs и Hypr, замена гомологичных генов приводит к равноценным изменениям в ЭТ а с увеличением размера изменяемого фрагмента увеличивается и степень воздействия на биологические свойства вируса (рис. 6-13). Так, замена генов E выщипывает снижение ЭТ в Hypr[Vs E] и повышение ЭТ в Vs[Hypr E] ( $p > 0.05$ ).



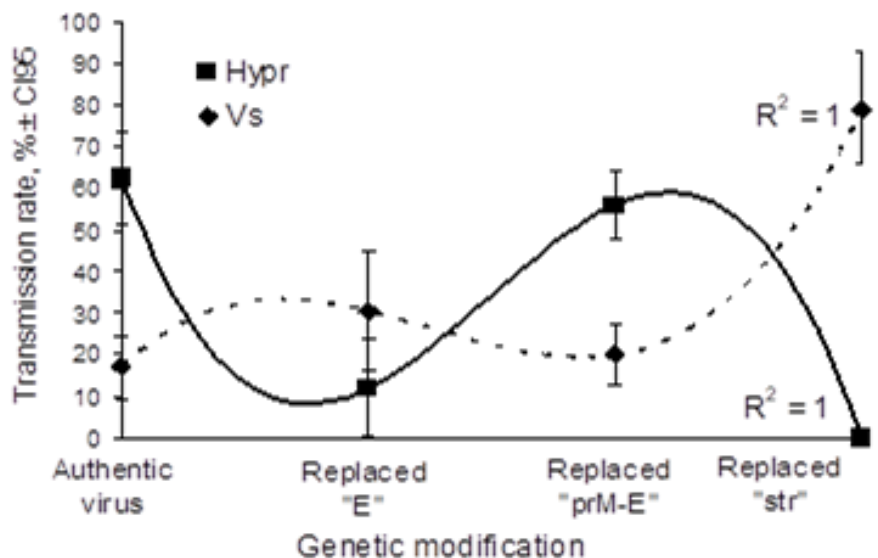
Однако, в случае сопоставления Hypr[Vs prM-E] и Vs[Hypr prM-E], изменения в ЭТ были еще более существенны ( $p < 0.05$ ). Более того, при замене целых структурных регионов генома (включая 5'UTR), результирующие изменения достигали или даже превышали показатели контрольных вирусов, с высокой достоверностью наблюдаемых различий ( $p < 0.01$ ).



**Рисунок 6-12. 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 (споршная линия) и титрами вируса в слюнных железах нимф и самок клещей (пунктирные линии) обозначены скобками с указанием значений коэффициента корреляции R.

Оптимальная статистическая модель, описывающая этот процесс оказалась полиномиальная регрессия третьей степени ( $R^2 = 1$ ). Согласно этой модели, прогрессирующие изменения в геноме приводят к волнообразным изменениям в ЭТ с нарастающей амплитудой, при этом ЭТ вирусов Vs and Hypr изменяется практически синхронно и антипараллельно (рис. 6-13). Так, максимальные значения ЭТ среди рекомбинантных вирусов на основе Vs соответствуют минимальным значениям среди рекомбинантных вирусов на основе Hypr и наоборот. Таким образом, гомологичные изменения в геномах

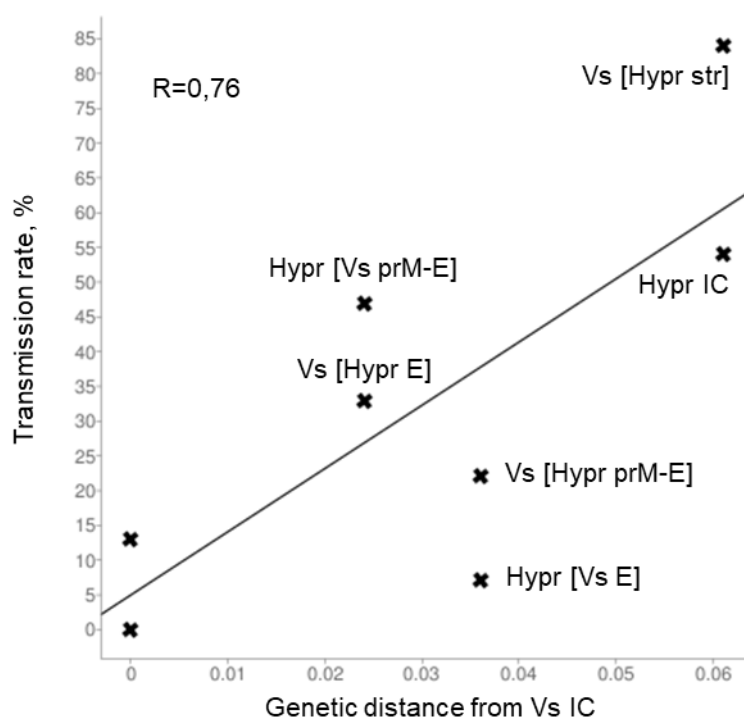
вирусов приводят к сопоставимым по качеству и интенсивности изменениям биологических свойств вирусных рядов.



**Рисунок 6-13.** Влияние изменений в геноме ВКЭ на ЭТ в *I. ricinus*. Сплошная линия отражает изменения эффективности неvirемической трансмиссии штамма Нург в по мере увеличения размера гетерологичного фрагмента генома. Пунктирная линия – то же самое для штамма Васильченко. Значения коэффициентов корреляции  $R^2$  приведены с правой стороны соответствующей линии тренда. Планки погрешностей отражают 95% доверительный интервал средних значений ЭТ во множественных повторях эксперимента.

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 6-14). Линейная регрессия указывает на сильную корреляцию между этими рядами данных ( $r = 0.75$ ). Так, наименьшие показатели ЭТ были ассоциированы с вирусами наиболее генетически близкими Vs IC, тогда как для наиболее удаленных вирусов были характерны наивысшие показатели ЭТ. Контрольные вирусы VsIC и HypIC находились у противоположных краев диаграммы, иллюстрируя как наибольшие генетические различия, так и фундаментальные различия в ЭТ. Рекомбинантные вирусы с гетерологичными E или prM-E генами

расположились в центральных частях графика, что указывает на ограниченное влияние аминокислотных замен в этих генах на ЭТ. Однако вирусы с гетерологичным комплексом структурных генов заняли противоположные от своих предковых форм позиции рядом с контрольными вирусами, которые послужили донорами структурной части генома (рис. 6-14). 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. Без него не работает.



**Рисунок 6-14. 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  $[Y = 914.53 \cdot X + 4.77]$  и отображена сплошной линией ( $R^2 = 0.58$ ). В верхнем левом углу графика указан коэффициент корреляции Пирсона ( $r = 0,76$ ).

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 C-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**

Попытки описать процесс естественной циркуляции ВКЭ были начаты очень давно - практически сразу после открытия этой инфекции [Паразитология..., 1947]. В течение короткого времени было разработано много схематических моделей, описывающих процессы взаимодействия вирусной популяции с организмами позвоночных и беспозвоночных хозяев под влиянием условий окружающей среды [Паразитология..., 1947; Петрищева П.А., 1958; Pretzmann G. и др., 1963, Вотяков и др., 2002 и др.]. Однако, несмотря на то, что в целом эти модели отражают общие закономерности существования ВКЭ, с их помощью невозможно оценить количественный вклад каждого компонента в эффективность репродукции ВКЭ в разных хозяевах и оценить устойчивость популяции вируса в естественных условиях (Рис. 7-1).

Чтобы восполнить недостатки схематических моделей, Э.И. Коренбергом и Ю.В. Ковалевским была предложена количественная модель циркуляции ВКЭ. В модели, на основе последовательных алгебраических расчетов, производится оценка зараженности клещей ВКЭ на разных стадиях развития под влиянием выживаемости имаго, яйцекладок, личинок и нимф. При этом в качестве исходного и определяющего параметра берется зараженность и выживаемость напивавшихся самок клещей [Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., 1977].

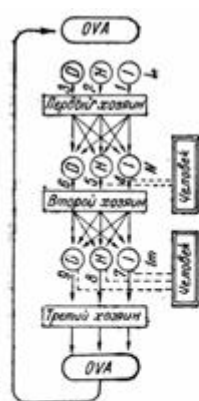


Рис. 127. Схема возможной передачи вируса энцефалита различными хозяевам различными видами клещей. Оригинал Е. Павловского.

L — личинка; N — нимфа; I — имago; OVA — яйца; I — I. ricinus; N — N. oxyma; D — D. marginatus.

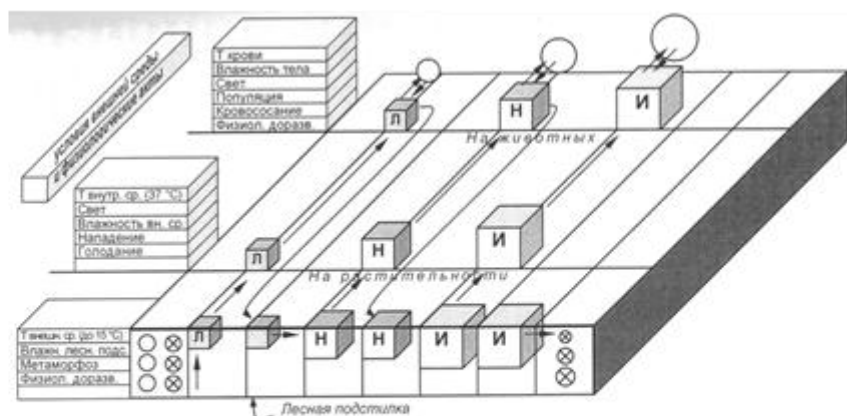


Рис. 3.1. Круговорот вируса в одном поколении клещей в сопоставлении с их физиологическим состоянием и условиями внешней среды.

⊗ — яйца; L — личинка; N — нимфа; I — имago; ○ ○ ○ — животные соответственно мелких, средних и крупных размеров; — — движение вируса.

**Рисунок 7-1.** Примеры схематических моделей циркуляции ВКЭ в природе. А) По Е.Н. Павловскому [Паразитология..., 194], Б) По В.И. Вотякову [Вотяков и др. 2002]

При всей простоте и наглядности, модель не лишена недостатков, о которых упоминают и сами авторы. Это, прежде всего, условность и упрощенность большинства используемых параметров. Так, например, в модели не предусмотрена оценка влияния неvirемической трансмиссии ВКЭ между клещами. Некоторые параметры, например выживаемость голодных личинок и нимф, взяты либо из неопубликованных данных (личные сообщения), либо гипотетически. Авторы также указывают на необходимость учитывать полиморфизм популяций ВКЭ при моделировании жизненного цикла вируса, поскольку предложенная модель этот параметр не включает [Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V., 1994]. Кроме того, алгебраический подход не дает возможности оценить взаимовлияние репродукции ВКЭ в разных хозяевах и эффективности различных путей трансмиссии, а только прогнозирует зараженность клещей ВКЭ на каждой из стадий развития.

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. и др., 2005]. Таким образом, показатель  $R_0$  представляет собой измерение собственного потенциала инфекционного агента и возможности его распространения [Темими Л., 2009]. Вычисление показателя  $R_0$  для конкретного патогена дает следующую информацию: (1) Поскольку  $R_0$  является пороговым показателем, то в том случае, когда  $R_0$  патогена  $> 1$ , возникновение эпидемии заболевания принципиально возможно, а если  $R_0 < 1$  патоген определенно будет элиминирован из популяции; (2) В том случае, если эпидемия заболевания возможна, величина  $R_0$  позволяет оценить риск реального возникновения эпидемии; (3) В случае, если эпидемия уже идет,  $R_0$  позволяет определить изначальное экспоненциальное увеличение числа зараженных индивидуумов; (4) Значение  $R_0$  позволяет определить долю популяции, которая должна быть вакцинирована для предотвращения эпидемии [Hartemink N.A. и др., 2008]. Так, вычисление  $R_0$  было ключевым фактором при оценке риска распространения тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом SARS-CoV [Lipsitch M. и др., 2003; Choi B.C., Pak A.W., 2003]. Расчет  $R_0$  лежал в основе разработки оптимальных мер контроля во время африканской эпидемии вируса Эбола 2013-2014гг. [Khan A. и др., 2015; Kiskowski M.A., 2014; Fisman D. и др., 2014]. Этот параметр также был успешно использован для оценки риска распространения и разработки стратегий предотвращения эпидемии этой инфекции в других регионах мира [Chen T. и др., 2014]. В настоящее время, показатель  $R_0$  широко используется для анализа распространения и заболеваемости многих социально и эпидемически значимых зоонозных инфекций, в частности гриппа [Wang L. и

др., 2014], лихорадки Денге [Reiner R.C. Jr. и др., 2014], лихорадки Западного Нила [Wonham M.J. и др., 2004] и др.

Изначально показатель  $R_0$  был разработан для патогенов, инфицирующих одного хозяина и имеющих один путь передачи. Однако, в применении к трансмиссивным природно-очаговым инфекциям, расчет  $R_0$  осложняется тем, что в этом случае инфекционные агенты имеют нескольких хозяев разных видов и при этом используют несколько путей циркуляции между хозяевами. Эти осложнения были решены с помощью математического подхода «next generation matrix», который позволяет учитывать в модели и разнообразие хозяев, и множественные пути передачи инфекции [Diekmann O. и др., 1990]. В ходе расчетов, на основе данных о биологии и экологии исследуемой инфекции, составляется матрица, содержащая все известные комбинации естественных хозяев и путей передачи патогена. После этого вычисляются собственные числа матрицы, и наибольшее собственное число является основным репродуктивным числом ( $R_0$ ) исследуемого инфекционного агента. Для математического моделирования процесса циркуляции ВКЭ и *B. burgdorferi sensu lato* в экосистемах Западной Европы был разработан ряд моделей для расчета значений  $R_0$  на основе биологических показателей *I. ricinus* [Hartemink N.A. и др., 2008]. Авторами были выделены 5 начальных состояний инфекции («type-at-birth»): k - (1) клещ, инфицированный на стадии яйца (посредством трансвариальной трансмиссии); (2) клещ, инфицированный на стадии личинки (во время первого кровососания); (3) клещ, инфицированный на стадии нимфы (во время второго кровососания); (4) самка клеща, инфицированная во время третьего кровососания; и (5) позвоночный хозяин – прокормитель клещей с выраженной системной инфекцией (виремией или бактеремией). Матрица следующего поколения  $K$  для системы из 5 начальных состояний будет матрицей  $5 \times 5$  (1). Каждый из элементов этой матрицы  $k_{ij}$  представляет ожидаемое количество новых случаев начального состояния инфекции  $i$  вызванных одним зараженным индивидуумом в

начальном состоянии инфекции  $j$  в течение периода его инфекционности. Например,  $k_{13}$  это среднее количество яиц (начальное состояние инфекции (1)), зараженных одним клещом, получившим инфекцию на стадии нимфы (начальное состояние инфекции (3)). Таким образом,  $k_{13}$  является компонентом трансовариальной трансмиссии. Кроме этого, при расчете  $k_{13}$  необходимо учесть, что не все клещи, зараженные на стадии нимфы, доживут до стадии имаго.

$$K = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & k_{13} & k_{14} & k_{15} \\ k_{21} & k_{22} & k_{23} & k_{24} & k_{25} \\ k_{31} & k_{32} & k_{33} & k_{34} & k_{35} \\ k_{41} & k_{42} & k_{43} & k_{44} & k_{45} \\ k_{51} & k_{52} & k_{53} & k_{54} & k_{55} \end{bmatrix} \quad (1)^*$$

\*Приводится по: [Hartemink N.A., с соавт. 2008]

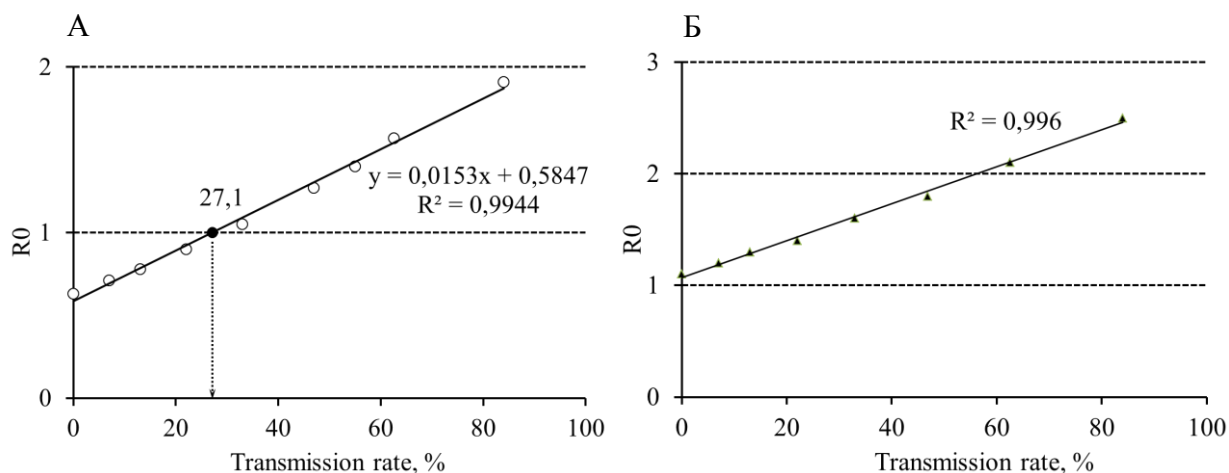
Для того чтобы оценить влияние генетического разнообразия на устойчивость циркуляции ВКЭ в системе *I. ricinus* – позвоночный хозяин, мы использовали вышеописанный подход и рассчитали значения  $R_0$  для разных генетических вариантов ВКЭ: ВКЭ европейского субтипа (Hypr IC), сибирского субтипа (Vs IC) и промежуточных рекомбинантных штаммов Hypr [Vs str], Vs [Hypr str], Hypr [Vs E], Hypr [Vs prM-E], Vs [Hypr E] и Vs [Hypr prM-E]. При этом для расчета элементов матрицы использовали биологические характеристики, полученные для каждого штамма 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 соавторами [2008]. Перечень использованных биологических параметров системы клещ – патоген – компетентный позвоночный хозяин, а также использованные нами их значения, приведены в таблицах 7-1 и 7-2.



Изначально, были сформированы два набора биологических характеристик. Первый набор был наиболее приближен к модели естественной циркуляции ВКЭ в природе и все значения кроме  $\Theta_{ij}$  соответствовали данным N.A. Hartemink с соавторами [2008]. Однако показатели эффективности неvirемической трансмиссии ( $\Theta_{ij}$ ) соответствовали экспериментально полученным результатам. Второй набор данных отражал циркуляцию ВКЭ в использованной лабораторной системе и включал оригинальные значения следующих параметров (табл. 8-1, 8-2):  $C_{NN} = 14$ ;  $C_{AN} = 2$ ;  $N_{NH} = 15$ ;  $N_{AH} = 2$ ;  $D_N = 3$ ;  $D_A = 3$ ; эффективность неvirемической трансмиссии ( $\Theta_{ij}$ ) в соответствии с экспериментальными результатами. N.A. Hartemink с соавторами [2008] отмечают, что большое значение для корректной оценки  $R_0$  в модели ВКЭ имеет доля клещей, питающихся на компетентном позвоночном хозяине ( $h_C$ ), способном поддерживать репродукцию вируса. В том случае, если менее 80% клещей питается на компетентном хозяине, циркуляция ВКЭ не будет устойчивой и вирус будет элиминирован из экосистемы. В нашей реконструкции во всех случаях был использован показатель  $h_C = 1$ , что соответствует наиболее благоприятному для циркуляции ВКЭ сценарию, когда каждый клещ питается на компетентном хозяине.

Модель на основе набора данных, максимально приближенного к естественной циркуляции ВКЭ, выявила, что величина показателя  $R_0$  с высокой достоверностью ( $R^2 = 0,994$ ) находится в прямой линейной зависимости от эффективности неvirемической трансмиссии ВКЭ (рис. 7-2 А). При этом линейный тренд пересекает пороговое значение  $R_0 = 1$  при эффективности неvirемической трансмиссии 27,1 %. Таким образом, можно предположить, что если при совместном питании ВКЭ будет передаваться неvirемическим путем менее чем 27 клещам из 100, то вирус не сможет устойчиво циркулировать в экосистеме даже в том случае, когда каждый клещ будет питаться на компетентном позвоночном хозяине. Анализ лабораторной модели циркуляции ВКЭ показал, что использованные

параметры являются избыточными и в лабораторных условиях ВКЭ вероятно способен существовать даже при полном отсутствии невяремической трансмиссии (рис. 7-2 Б).



**Рисунок 7-2. Зависимость  $R_0$  от эффективности невяремической трансмиссии.** А) на основе набора данных, максимально приближенного к естественной циркуляции ВКЭ по: [Hartemink N.A. с соавт., 2008] Б) в условиях лабораторного эксперимента.

С практической точки зрения, полученные результаты могут быть интерпретированы как теоретическое подтверждение потенциальной возможности контроля, и даже элиминации, ВКЭ в природе без необходимости физического уничтожения популяций клещей и позвоночных хозяев.

Вклад эффективности невяремической трансмиссии в устойчивость циркуляции ВКЭ в природе заложен в показателях  $k_{21} - k_{23}$ ,  $k_{31} - k_{33}$  и  $k_{41} - k_{43}$  (2), отражающих вероятность заражения клещей на стадии личинки, нимфы и имаго от клещей, зараженных на стадии яйца, личинки и нимфы. Невяремическая передача от клеща, инфицированного на стадии имаго, исключена, поскольку иксодовые клещи питаются однократно на каждой стадии развития (показатели  $k_{25}$ ,  $k_{34}$  и  $k_{44}$  равны нулю).

Помимо собственно эффективности невяремической трансмиссии от клеща на стадии  $i$  клещу на стадии  $j$  ( $\Theta_{ij}$ ), уравнения для расчета вероятности невяремической передачи ВКЭ включают в себя показатели выживаемости

клещей на каждой стадии развития ( $S_i$ ), средние количества клещей на стадии  $i$  питающихся совместно с клещами на стадии  $j$  ( $C_{ij}$ ) и долю клещей, питающихся на компетентном хозяине ( $h_C$ ).

$$K = \begin{bmatrix} TO & TO & TO & TO & 0 \\ HB & HB & HB & 0 & nx \rightarrow L \\ HB & HB & HB & 0 & nx \rightarrow N \\ HB & HB & HB & 0 & nx \rightarrow A \\ кл \rightarrow nx & кл \rightarrow nx & кл \rightarrow nx & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2)$$

Приводится по: [Hartemink N.A. и др., 2008]. *TO* – трансвариальная передача ВКЭ; *HB* – неvirемическая передача; *nx* → *A* - передача от позвоночного хозяина к имаго; *nx* → *N* - от позвоночного хозяина к нимфам; *nx* → *L* - от позвоночного хозяина к личинкам; *кл* → *nx* - передача от клещей на разных стадиях развития к позвоночным хозяевам; 0 – отсутствие передачи.

В современной практике, для контроля циркуляции ВКЭ фактически прибегают к искусственному снижению  $S_i$  с помощью обработок местности ядохимикатами. Естественно, что эффект такого воздействия ограничен местом проведения химических обработок и временем действия яда. Кроме того, обработки воздействуют не на все начальные состояния инфекции – ядохимикаты поражают главным образом активных клещей, находящихся в процессе поиска хозяина. Присосавшиеся клещи, яйца, а также неактивные в данный момент особи выживают и служат резервуаром для восстановления популяции клещей и ассоциированных с ними инфекций. Нельзя также недооценивать позвоночных хозяев, которые служат как «убежищем» для активных стадий клещей, так и резервуаром клещевых патогенов за счет развития острой системной, локальной кожной и хронической инфекции.

В рамках нашей реконструкции эпизоотического процесса изменения затрагивали только значения  $\Theta_{ij}$ , и были обусловлены фундаментальными различиями взаимодействия клещей и ВКЭ разных субтипов. Снизив специфичность взаимодействия ВКЭ и переносчика за счет модификации генетической структуры ВКЭ, мы получили снижение  $\Theta_{ij}$  и, как следствие

снижение  $R_0$ . Естественно, контроль циркуляции ВКЭ за счет модификации генома вируса вне лабораторного эксперимента принципиально невозможен – модифицированные штаммы ВКЭ со сниженными трансмиссивными характеристиками просто будут элиминироваться из популяции, а распространение будут получать штаммы дикого типа с нормальной способностью к невиремической трансмиссии. Однако, как было отмечено многими авторами, патоген и переносчик ко-адаптируются друг к другу, то есть не только определенный субтип ВКЭ приспособлен к определенному виду клеща, но и клещи данного вида также имеют наследственные качества, необходимые для выживания инфицированных ВКЭ особей. Таким образом, гипотетически, снизить значение  $\theta_{ij}$  можно не только за счет модификации свойств ВКЭ, но и за счет модификации специфичных клещей-переносчиков или позвоночных хозяев.

**Таблица 7-1.** Биологические параметры клещей *I. ricinus*

	Символ	Параметр	I. ricinu s*	Hypr IC	Hypr [Vs str]	Vs IC	Vs [Hypr str]	Hypr [Vs E]	Hypr [Vs prM- E]	Vs [Hypr E]	Vs [Hypr prM- E]
1	$E$	Среднее количество яиц, откладываемых одной самкой	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
2	$S_L$	Вероятность выживания клеща от яйца до питающейся личинки	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	$S_N$	Вероятность выживания клеща от личинки до питающейся нимфы	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4	$S_A$	Вероятность выживания клеща от нимфы до питающейся самки	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5	$C_{LL}$	Среднее количество личинок, питающихся совместно с одной личинкой	30	30	30	30	30	30	30	30	30
6	$C_{NL}$	Среднее количество нимф, питающихся совместно с одной личинкой	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	$C_{AL}$	Среднее количество имаго, питающихся совместно с одной личинкой	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
8	$C_{LN}$	Среднее количество личинок, питающихся совместно с одной нимфой	20	20	20	20	20	20	20	20	20
9	$C_{NN}$	Среднее количество нимф, питающихся совместно с одной нимфой	1	14	14	14	14	14	14	14	14
10	$C_{AN}$	Среднее количество имаго, питающихся совместно с одной нимфой	0,01	2	2	2	2	2	2	2	2
11	$C_{LA}$	Среднее количество личинок, питающихся совместно с одной самкой	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
12	$C_{NA}$	Среднее количество нимф, питающихся совместно с одной самкой	0,01	15	15	15	15	15	15	15	15
13	$C_{AA}$	Среднее количество имаго, питающихся совместно с одной самкой	0,01	1	1	1	1	1	1	1	1
14	$N_{LH}$	Среднее количество личинок на компетентном хозяине	6	6	6	6	6	6	6	6	6
15	$N_{NH}$	Среднее количество нимф на компетентном хозяине	0,2	15	15	15	15	15	15	15	15

\* согласно Hartemink et al. [2008]

**Таблица 7-1 (окончание).** Биологические параметры клещей *I. ricinus*

	Символ	Параметр	I. ricinu s*	Hypr IC	Hypr [Vs str]	Vs IC	Vs [Hypr str]	Hypr [Vs E]	Hypr [Vs prM- E]	Vs [Hypr E]	Vs [Hypr prM- E]
16	$N_{AH}$	Среднее количество имаго на компетентном хозяине	0,001	2	2	2	2	2	2	2	2
17	$D_L$	Продолжительность питания личинок (дней)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
18	$D_N$	Продолжительность питания нимф (дней)	3,5	3	3	3	3	3	3	3	3
19	$D_A$	Продолжительность питания имаго, самок (дней)	12	3	3	3	3	3	3	3	3
20	$h_C$	Вероятность пропитания на компетентном хозяине (доля особей, питавшихся на компетентном хозяине)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\* согласно Hartemink et al. [2008]

Таблица 7-2. Биологические параметры ВКЭ.

	Символ		I. ricinu s*	Hypr IC	Hypr [Vs str]	Vs IC	Vs [Hypr str],	Hypr [Vs E]	Hypr [Vs prM- E]	Vs [Hypr E]	Vs [Hypr prM- E]
1	$i$	Продолжительность виремии (дней)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	$\theta_{LL}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от личинок к личинкам	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
3	$\theta_{NL}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от нимф к личинкам	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
4	$\theta_{AL}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от имаго к личинке	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
5	$\theta_{LN}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от личинок к нимфам	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
6	$\theta_{NN}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от нимф к нимфам	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
7	$\theta_{AN}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от имаго к нимфам	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
8	$\theta_{LA}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от личинок к имаго	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
9	$\theta_{NA}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от нимф к имаго	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
10	$\theta_{AA}$	Эффективность неvirемической трансмиссии от имаго к имаго	0,55	0,625	0	0,13	0,84	0,07	0,47	0,33	0,22
11	$p_L$	Эффективность virемической трансмиссии от хозяина к личинкам	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
12	$p_N$	Эффективность virемической трансмиссии от хозяина к нимфам	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
13	$p_A$	Эффективность virемической трансмиссии от хозяина к имаго	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
14	$q_L$	Эффективность трансмиссии от личинок к хозяину	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
15	$q_N$	Эффективность трансмиссии от нимф к хозяину	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9

**Таблица 7-2 (окончание).** Биологические параметры ВКЭ.

16	$q_A$	Эффективность трансмиссии от имаго к хозяину	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
17	$r_A$	Эффективность вертикальной трансмиссии от самок к яйцам	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

\* согласно Hartemink et al. [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 *Borrelia garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, вируса клещевого энцефалита, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii*, 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 неких общих механизмов формирования региональных популяций микроорганизмов,

которые адаптированы к циркуляции в эндемичных видах позвоночных и беспозвоночных хозяев.

Так, на территории Восточной Сибири и Монголии циркулируют три вида боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* – *B. garinii*, *B. bavariensis* и *B. afzelii*. Анализ трех вариабельных фрагментов генома – спейсера *rrfA-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 *rrfA-rrlB* 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.

В отношении разнообразия микроорганизмов порядка *Rickettsiales*, нами установлено, что иксодовые клещи на территории Монголии и Восточной Сибири инфицированы по меньшей мере 5 видами – *R. sibirica*, *R. raoultii*, *E. muris*, “*Montezuma*” и *Candidatus R. tarasevichiae*. Зараженность

клещей этими микроорганизмами достигает высоких показателей. Порядка 70 % клещей рода *Dermacentor sp.* и 30-40 % клещей *I. persulcatus* инфицированы риккетсиеподобными бактериями. Неожиданно низкой оказалась зараженность *R. sibirica* – лишь 3,4 % всех риккетсий, обнаруженных в клещах *Dermacentor sp.* относятся к этому виду. Обнаружены риккетсии с необычной структурой гена *rOmpA*; высока вероятность того, что этот вариант *rOmpA* принадлежит *Candidatus R. tarasevichiae*. Кроме ожидаемых бактерий порядка *Rickettsiales*, анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA выявил инфицированность таежных клещей микроорганизмами вообще не относящихся к альфа-1-протеобактериям. Наиболее близкородственными им оказались гама- и бета-протеобактерии родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*.

По нашему мнению, все эти микроорганизмы способны устойчиво циркулировать в биоценозах Прибайкалья и Монголии в течение неограниченного времени. При этом, значение большинства из обнаруженных нами микроорганизмов для здоровья человека неясно, однако любой из них имеет возможность инфицировать человека при укусе клеща.

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, с высокой вероятностью того, что получаемые данные отражают естественные процессы, происходящие в природных очагах.

Было обнаружено, что ВКЭ обладает двумя типами генетической изменчивости, приводящих 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. Нами выявлены и исследованы три такие аминокислотные позиции 67, 122 и 277, однако углубленный анализ опубликованных нуклеотидных последовательностей указывает на существование аналогичных мутаций в других частях гена Е 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.

Нами было показано, что адаптация ВКЭ к организму разных видов клещей достигается за счет генетической изменчивости комплекса структурных генов С, ргМ 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 ргМ и оболочечный белок Е, 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. 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 группе 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» микроорганизмов, представляющих опасность для человека, 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 этих инфекций обеспечивается за счет формирования региональных популяций микроорганизмов, которые адаптированы к циркуляции в эндемичных экосистемах. На генетическом уровне это проявляется в существенном внутривидовом полиморфизме первичной структуры геномов ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *Rickettsia sp.* и приуроченности генетических вариантов к определенным эколого-географическим районам.
3. Обнаружено, что, вне зависимости от субтипа вируса, при адаптации ВКЭ к организму хозяина происходят точечные мутации в позициях 67, 122 и 277 белка Е ВКЭ. Эти мутации экспонированы на поверхности вириона и приводят к сдвигу заряда и\или гидрофобности поверхности вириона ВКЭ. У ВКЭ с данным типом адаптивной изменчивости нет способности к формированию устойчивых природных популяций, их доля в общей популяции вируса составляет порядка 7%.
4. Установлено, что устойчивая невиремическая трансмиссия ВКЭ возможна только при точном соответствии целого региона генома, кодирующего 5' нетранслируемый регион, капсидный белок С, мембранный белок ргМ и оболочечный белок Е, 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.

5. При эффективности неvirемической трансмиссии ВКЭ Европейского субтипа ниже 27% циркуляция вируса между зараженными и незараженными клещами *I. ricinus* становится малоэффективной. В естественных условиях это с высокой вероятностью приведет к снижению зараженности клещей ВКЭ или даже к элиминации вируса из популяции клещей.

6. Вирулентность ВКЭ для клеток млекопитающих определяется свойствами неструктурных генов вируса, однако точечные 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. 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, обеспечивающие наиболее эффективную неvirемическую трансмиссию среди эндемичных видов клещей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимов И.А., Небогаткин И.В. Иксодовые клещи и болезнь Лайма в Украине // Вестн.зоол.- 1995.- №1.- с.73-75.
2. Алексеев А.Н., Чунихин С.П. Обмен вирусом клещевого энцефалита между иксодовыми клещами, совместно питающимися на животных с подпороговым уровнем вирусемии // Мед. паразитол. - 1990. - № 2. – с. 48—50.
3. Алексеев А.Н., Чунихин С.П. Различия в дистантной передаче вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами двух подсемейств // Паразитология. 1992. – 26(6). – с. 506-515.
4. Алексеев А.Н., Арумова Е.А., Буренкова Л.А. и др. Об особенностях распространения возбудителя болезни Лайма и поведения зараженных им клещей рода Ixodes // Паразитология. - 1993. - Т. 27, вып. 6. – с. 389-398.
5. Амосов А.Д. Клещевой энцефалит. Информационно-методическое пособие // ЗАО «Вектор-Бест» Кольцово. - 2006. – с. 3-48.
6. Ананьева Л.П., Сотыбалдыев А.М., Скрипникова И.А. и др. Описание случая болезни Лайма в Восточной Сибири // Мед. Паразитол. и паразитарные болезни.- 1991.- №4.- С. 13-14.
7. Андаев Е.И. Научно-организационные основы эпидемиологического надзора за природно-очаговыми и особо опасными вирусными инфекциями в Восточной Сибири // Автореф... дисс... д.м.н. – Иркутск, 2009. – 46С.
8. Афанасьева М. В., Воробьева Н. Н., Коренберг Э. И. и др. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России // Инфекционные болезни: научно-практический журнал Российского общества инфекционистов. — 2006. — Том 4,N 2 . — с. 24-28.
9. Балахонов С.В., Пакскина Н.Д., Никитин А.Я., Носков А.К., Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Шашина Н.И., Германт О.М., Сидорова Е.А. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в



- российской федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 1. С. 34-37.
10. Балашов Ю.С. Иксодовые клещи - паразиты и переносчики инфекций.- СПб.: Наука, 1998.- 287С.
  11. Балашов Ю.С. Место иксодовых клещей в лесных экосистемах // Паразитология.- 1996.-Т.30 Вып.3.- С.193-203.
  12. Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Матвеева В.А., Матвеев Л.Э., Морозова О.В. Персистенция вируса клещевого энцефалита в организме диких мелких млекопитающих и в культурах перmissive клеток // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007. - №11. – с.79–87.
  13. Васильева И.С., Наумов Р.Л. Паразитарная система болезни Лайма, состояние вопроса. Сообщение 1. Возбудители и переносчики // Acarina.- 1997.- 4 (1-2). – с. 53-75.
  14. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции). - Новосибирск: Наука. - 2002. - 160 с.
  15. Галимов В. Р., Галимова Э. З., Катин А. А., Колнанова Л. П. Передача вируса клещевого энцефалита взрослым таежным клещам при отсутствии вирусемии у их прокормителей // 12-я Всесоюз. конф. по природной очаговости болезней. Тез. докл. (10—12 окт. 1989 г., Новосибирск). - М. - 1989. - с. 43—44.
  16. Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Постик Д., Барантон Г. Изоляция боррелий от клеща *I. trianguliceps* и возможное значение этого вида в эпизоотологии иксодовых клещевых боррелиозов // Паразитология. - 1996. - 30, 1. - с. 13-18.
  17. Горин О.З., Злобин В.И., Арбатская Е.В. и др. Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактики трансмиссивных инфекций в Сибири // Журн. инфекционной патологии (Иркутск). - 1996. - Т.3, №4. - с. 10-12.

18. Горин О.З., Зубаков Д.Ю., Злобин В.И., Огарков О.Б., Ф.д,А. Дэмбеле, Черногор Л.И., Сунцова О.В., Беликов С.И *Borrelia garinii* - один из этиологических агентов клещевого боррелиоза в пригородной зоне Иркутска // Журнал инфекционной патологии (Иркутск).- 1998. - Т.5 №2. - с. 62-63.
19. Данчинова Г. А., Ляпунов А. В. Петрова И. В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, результаты лабораторных исследований их клещей и сывороток крови, и меры профилактики» (ИСС «Клещи») // Электронный бюллетень – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, М. – 2009. – № 1. – с.431-432.
20. Девятков М.Ю., Фельдблюм И.В., Горбань Л.Я. Значение акарицидных обработок в профилактике клещевого энцефалита // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2006. - №1. - с.32-36.
21. Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Верховина М.М., Козлова И.В., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Злобин В.И. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопросы вирусологии. - 2009. - 54(3). – с.33-42.
22. Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Парамонов А.И., Злобин В.И. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования // Вопросы вирусологии. - 2012. - Т. 57. № 4. - с.13-18.
23. Джигоев Ю.П., Злобин В.И. Молекулярно-эпидемиологический и филогенетический анализ природных популяций вируса клещевого энцефалита на основе гибридизационных тестов (азиатская часть ареала) // В кн.: В.И. Вотяков, В.И.Злобин, Н.П. Мишаева, Клещевые энцефалиты Евразии. – Н. «Наука». – 2002. – с.186–211.

24. Джигоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И., Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Восточной Сибири // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2012. - Т.111. № 4. - с.80-85.
25. Злобин В.И., Беликов С.И., Джигоев Ю.П., Демина Т.В., Козлова И.В. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 272 с.
26. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит: этиология, эпидемиология и профилактика в Сибири // Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН. - 1996. – 177 с.
27. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки Е // Вопр. Вирусол. – 2001. - №1. – с. 16-21.
28. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В., Бутина Т.В., Беликов С.И., Горин О.З., Джигоев Ю.П., Верховина М.М., Козлова И.В., Воронко И.В., Адельшин Р.В., Грачев М.А. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е // Вопросы вирусологии. - 2001. - Т.46. № 1. - с.12-16.
29. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г., Левина Л. С., Ливанова Г. П., Колясникова Н. М., Гамова Е. Г., Трухина А. Г., Злобин В. И., Верховина М. М., Козлова И. В., Джигоев Ю. П., Демина Т. В., Погодина В. В. Применение молекулярно-генетических методик для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюлл. СО РАМН. - 2007. - №4(126). - с.34-40.
30. Карпов С.П. Томский очаг КЭ и вопросы его оздоровления // В кн.: Клещевой энцефалит. - Минск. – 1965. - с.212-221.

31. Кисленко Г.С., Короткое Ю.С., Чунихин С.П. Участие птиц в циркуляции вируса клещевого энцефалита в Азиатской части России. Сообщение 2. Средняя Сибирь // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. – 1993. – №1. – с.21-26.
32. Ковалевский Ю.В., Коренберг Э.И., Дауйотас С.В. Оценка различных способов приготовления витальных препаратов для выявления боррелий у иксодовых клещей // Мед. Паразитол. и паразитарные болезни.-1990, №1.- с. 33-35.
33. Ковалевский Ю.В., Коренберг Э.И., Кутлина Т.В., Устинова О.А. Нормы просмотра препаратов при исследовании нимф иксодовых клещей методом темнопольной микроскопии в очагах боррелиозов.//, Мед. Паразитол. и паразитарные болезни. 1996, №4.- с.18-21.
34. Козлов С.С. Лайм-боррелиоз в Северо-Западном регионе России.// Автореф. Дис. Докт. Мед. Наук. СПб, 1999. - с.16-17.
35. Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующей в Восточной Сибири // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - №3(64). - с.14-25.
36. Козлова И.В., Злобин В.И., Верховина М.М., Лисак О.В., Сунцова О.В., Бадиева Л.Б., Чумаченко И.Г. Опыт работы по экспресс-диагностике и экстренной профилактике клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза в г. Иркутске // Дезинфекционное дело. - 2007. - № 1. - с. 38-41.
37. Колчанова Л.П. Спонтанная зараженность клещей боррелиями и степень их индивидуальной инфицированности в различных ландшафтных подзонах Тюменской области // Мед. Паразитол. и паразитарные болезни. - 1997. - №1.- с. 49-50.
38. Коренберг Э.И., Пчелкина А.А., Солошенко И.З., Дунаева Т.Н. Изучение благородных оленей (*Cervus elaphus*) в сопряженных очагах

- клещевого энцефалита, риккетсиозов, лептоспирозов и туляремии // Зоологический журнал. – 1975. – Т.54. № 7. – с.1057.
39. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Общая схема циркуляции вируса клещевого энцефалита // Зоол. журн. - 1977. - Т.56(10). – с.1467–1478.
40. Коренберг Э.И. Границы ареала и его тип // В кн.: Таежный клещ *I. persulcatus*. - Л.: Наука, 1985. - с.188-199.
41. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Кузнецова Р.И. и др. Выявление и первые результаты изучения болезни Лайма на Северо-западе СССР // Мед. Паразитол. и паразитарные болезни. - 1988. - №1.- с.45-48.
42. Коренберг Э.И. Болезнь лайма // Мед. паразитол. и паразитарные болезни. - 1993. - №1.- с.48-51.
43. Коренберг Э.И. Инфекции группы Лайм боррелиоза - иксодовые клещевые боррелиозы в России // Мед. Паразитол. и паразитарные болезни. - 1996. - №3. - с.14-18.
44. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Постик Д. и др. Резервуарные хозяева и переносчики боррелий - возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в России // Журн. Микробиол. Эпидемиол. и Иммунол. – 1997. – №6. – с. 36-38.
45. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Основные черты эко-эпидемиологии клещевого энцефалита [Электронный ресурс] // Вестник инфектологии и паразитологии. - 2000. – [Режим доступа]: <http://www.infectology.ru/publik/stat18.aspx>.
46. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2013. № 5 (72). - с. 7–17.
47. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Под ред. А.Л. Гинцбурга и В.Н. Злобина // Москва, типография «Наука», 2013. - 463 с.

48. Коренберг Э. И., Сироткин М. Б., Ковалевский Ю. В. Общая схема циркуляции возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в природных очагах Евразии // Зоологический журнал. 2016. - Т.95. № 3. – с. 283–299
49. Косых Н.Г., Котова Н.В., Хабудаев В.Л. и др. Клиническая характеристика болезни Лайма в городе Иркутске // В кн. "Актуальные вопросы инфекционной патологии". - Иркутск, 1993.- №1.- с. 32-35.
50. Косых Н.Г., Эпидемиологические и клинико-патогенетические аспекты иксодового клещевого боррелиоза в Восточной Сибири.// Дис. канд. биол. Наук. - Иркутск.- 2001.
51. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты. Под ред. Сомовой Л.М. // Москва, Изд.И.В. Балабанов, 2009. – с. 42-44.
52. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Джигоев Ю.П. Филогенетический анализ штаммов, вызвавших клещевой энцефалит в Приморском крае с различной тяжестью течения // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – № 1. – С. 53–56.
53. Лесняк О.М., Клинико-эпидемиологические закономерности Лайм-боррелиоза на Среднем урале // Автореф дисс...докт.мед. наук. – М., 1995.- 51с.
54. Лобзин Ю.В., Рахманова А.Г., Антонов В.С., Усков А.Н., Антыкова Л.П., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Платошина О.В. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов // Рекомендации для врачей. МЗ Российской Федерации. Комитет по здравоохранению Администрации Санкт-Петербурга. Санкт-Петербург 2000.
55. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). // С.-Пб., «Издательство Фолиант». - 2000. - 156с.
56. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. - 2007. - Т. 52. № 5. - с. 10-16.

57. Малыгин А.А., Бондаренко Е.И., Иванисенко В.А., Протопопова Е.В., Карпова Г.Г., Локтев В.Б. Картирование рецепторного домена для вирусов венесуэльского энцефалита лошадей и клещевого энцефалита на с-конце ламининсвязывающего белка человека // Биохимия. – 2009. – Т.74. № 12. – с. 1631-1641.
58. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю.. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма) // Кольцово, ЗАО «Вектор-Бест». - 2005. - 85 с.
59. Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Вержуцкая Ю.А., Никитин А.Я., Корзун В.М. Мелкие млекопитающие как резервуар вируса клещевого энцефалита в природных очагах Прибайкалья: современная ситуация // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2017. – Т.22. – с.41-47.
60. МКБ - 10 Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принята 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения. Адаптированный вариант. Подготовлен в отделе медицинской демографии и Международной классификации болезней НИИ социальной гигиены, экономики и управления здравоохранением им. Н.А. Семашко РАМН. Введен в действие приказом Минздрава Российской Федерации от 27.05.97 N 170  
Дата введения: 01.01.99 г.
61. Морозова О.В., Бахвалова В.Н. Природные циклы и клещевой энцефалит // В мире научных открытий. – 2010. - №2(08).1. – с.31-37.
62. Москвитина Г.Г., Коренберг Э.И., Горбань Л.А. Присутствие боррелий в кишечнике и слюнных железах спонтанно зараженных взрослых клещей *Ixodes persulcatus schulze* при кровососании // Мед. Паразитол. И паразитарные болезни. - 1995. - №3.- с.16-20.
63. Москвитина Н.С., Коробицын И.Г., Тютеньков О.Ю., Гашков С.И., Кононова Ю.В., Москвитин С.С., Романенко В.Н., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Тупота Н.Л., Семенцова А.О., Терновой В.А., Локтев В.Б. Участие птиц в

- поддержании клещевых инфекций в Томском антропургическом очаге // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014. – №4 – с. 408.
64. Научная электронная библиотека eLibraryRu [Электронный ресурс]. – М. –2019. - Режим доступа: [<http://elibrary.ru/>].
65. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. и др. Микроорганизмы порядка Rickettsiales (*Ixodes persulcatus* Shc.) в Предуралье // Вестник Российской академии медицинских наук: ежемесячный научно-теоретический журнал.- РАМН. - 2008. - N 7 . - с. 47-50.
66. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетические варианты *Borrelia garinii* - широко распространенного евразийского возбудителя заболеваний группы иксодовых клещевых боррелиозов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2010. - № 3. – с. 7-12.
67. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году: Государственный доклад.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2014.—191 с.
68. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад // М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. - 2018. - 268 с.
69. Огурцов А.А., Рязанцева Г.А., Левков П.А., Горшкова П.С., Ходакова Е.М., Ходаков П.Е., Ермишев Ю.В. Эффективность борьбы с иксодовыми клещами – переносчиками возбудителей природно-очаговых инфекций на юге Тюменской области // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2005. - № 3. – с. 15-19.
70. Паразитология Дальнего востока. Под ред. Е.Н. Павловского // Медгиз Л. - 1947. – 427 с.
71. Петрищева П.А. Клещевой энцефалит // М.. - 1958. – 78 с.



72. Петрова И.В., Савелькаева М.В., Горбунова Е.Л., Долгих В.В., Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В. Информационно-справочная система «Вакцинация населения Иркутской области против клещевого энцефалита» (ИСС «Вакцинация») // Электронный бюллетень – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, М. – 2011. – № 3 (76). – с. 646.
73. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 13.02.2014 №01/1567-14-32 «О перечне эндемичных территорий по клещевому вирусному энцефалиту в 2013г.»
74. Погодина В. В., Бочкова Н. Г., Дживанян Т. И. и др. Явление антигенной дефектности у циркулирующих в природе штаммов вируса клещевого энцефалита и его возможная связь с серонегативными формами заболевания // Вопр. вирусологии. - 1992. - 37, N2 : 0507-4088. - с. 103-107.
75. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С., Трухина А.Г., Левина Л.С., Маленко Г.В., Дружинина Т.А., Лукашенко З.С., Дулькейт О.Ф., Платонов А.Е.и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов // Вопр. вирусологии – 2004. – № 4. – с. 20–25.
76. Предварительные итоги эпидемического сезона клещевых инфекций 2010г [Электронный ресурс]. – Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Иркутской области, 2006-2011г. – 2011. – Режим доступа: [[http://38.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic\\_situation/43074/](http://38.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/43074/)].
77. Приказ № 266 Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 «Правила клинической практики в Российской Федерации».
78. Романенко В.В., Есюнина М.С., Килячина А.С. Опыт реализации программы массовой иммунизации населения против клещевого

- энцефалита в свердловской области // Вопросы вирусологии. - 2007. - Т. 52. № 6. - с. 22-25.
79. Рудаков Н.В. Таксономия, экология и эволюционные связи риккетсий // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2008. - № 7. - с. 10-15.
80. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Ястребов В.К., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В., Коломеец А.Н. Основные итоги разработки проблемы риккетсиозов, передающихся иксодовыми клещами, в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - № 5. - с. 29-33.
81. Салдан И.П., Прейдер В.П., Безруков Г.В. Заболеваемость клещевым энцефалитом в Алтайском крае // Эпидемиология инф.болезни. – 2000. - вып. 6. – с. 14-15.
82. Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Якименко В.В., Рудаков Н.В. Изучение адаптации *Rickettsia raoultii* к основным переносчикам — клещам рода *Dermacentor* с использованием экспериментальных методов // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2013. - Т. 120. № 5. - с. 59-61.
83. Сидорова Е.А., Карань Л.С., Борисова Т.И., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Трухина А.Г., Туранов А.О., Нагибина О.А., Погодина В.В., Лапа С.Э., Балахонов С.В. Генетическое разнообразие популяции вируса клещевого энцефалита на территории национального парка "Алханай" (Забайкальский край) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2012. – Т.111. № 4. – с.75-78.
84. Солнцев И.Г., Горин О.З., Лопина Н.И. Результаты исследований на Лайм-боррелиоз в Иркутской области // Сб. науч. работ. – Иркутск. – 1992. – с. 100-102.
85. Солнцев И.Г., Горин О.З., Иванова Н.И. Результаты серологического исследования на Лайм-боррелиоз в Иркутской области.// Бюлл. Сиб. О. РАМН (Новосибирск). - 1993. - №4. - с. 55-56.
86. Столбов Н.М., Билалова Э.З. О носительстве вируса КЭ птицами в природных очагах инфекций южной части лесной зоны Западно-

- Сибирской равнины // Вопросы краевой инфекционной патологии. – Тюмень. - 1970. – с. 47-48.
87. Стронин О. В., Шутова Н. А., Петров Е. Ю., и др. Изоляция и типирование возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов на территории Томской области // "Клещевые и паразитарные болезни". Материалы круглого стола в рамках Всероссийской научной конференции "Клинические перспективы в инфектологии». Санкт-Петербург 17-18 октября 2001г. – С-Пб. – 2001. – с. 49-51.
88. Сунцова О.В., Горин О.З., Козлова И.В. и др. Система "переносчик - возбудитель" в смешанных очагах клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза.// Международн. Науч. Конф. "Вирусн., риккетсиозн. И бактериальн. Инфекции, переносимые клещами". Тез. докл. Иркутск. - 1996. - с. 96-97.
89. Тарасов В.Н., Г.Н. Бобровская, О.Н. Кондрашова, Э.В. Ульяновченко, Н.Г. Оселедчик. Болезнь Лайма в Челябинской области (1991-1998) // Эпидемиология и инфекционные болезни. - №4. - 2000 - с.- 16-17.
90. Темими Л. Влияние пневмококковой вакцинации на здоровье общества // Педиатрическая фармакология. – 2009. – Т.6, № 5. – с. 48-54.
91. Трухина А.Г. Особенности циркуляции возбудителя КЭ в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья // Дис....канд. мед. Наук. – Иркутск. – 1989. – 176 с.
92. Трушина Ю.Н., Сидорова Е.А., Адельшин Р.В., Андаев Е.И. Молекулярно-генетическая характеристика боррелий, выявленных в клещах *Ixodes persulcatus* в забайкальском крае // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4. № 1. - с. 95.
93. Усков А.Н., Лобзин Ю.В., Бургасова О.А. Клещевой энцефалит, эрлихиоз, бабезиоз и другие актуальные клещевые инфекции в России // Инфекционные болезни. - 2010. – 8, №2. – с. 83-88.
94. Фадеева И. А., Нефедова В. В., Коренберг Э. И., Горелова Н.Б. Генетические варианты *Borrelia afzelii* - одного из возбудителей иксодовых

- клещевых боррелиозов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология: научно-теоретический журнал. — 2005. — N 3 . — с. 18-22.
95. Федоров В.Г. О видовом составе птиц – хозяев клеща иксодес персулькатус в Западной Сибири // Медицинская география. Омск. – 1973. – с. 64-66.
96. Физико-географический атлас мира // М. – АН СССР и ГУ геодезии и картографии ГГК СССР. – 1964. – 298 с.
97. Филипова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства Ixodidae // Паукообразные. Фауна СССР.- Л.: Наука, 1977.- Т.4, вып.4.- 396 с.
98. Филиппова Н.А. Таксономические аспекты переноса возбудителя болезни Лайма // Паразитология. – 1990. - Т. 24, вып. 4. - с. 257-266.
99. Хельсинская декларация всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (в редакции 52-й сессии Генеральной Ассамблеи ВМА в Эдинбурге, Шотландия, октябрь 2000 г).
100. Черногор Л.И., Эпидемиологические особенности клещевого боррелиоза в Предбайкалье // Дис. канд. биол. Наук. - Иркутск.- 1999. – 59 с.
101. Чунихин С.П., Леонова Г.Н. Экология и географическое распространение арбовирусов // М.: Медицина. – 1985. – 125 с.
102. Шашина Н.И., Германт О.М. Новое в неспецифической профилактике инфекций, возбудителей которых передают иксодовые клещи. Инфекция и иммунитет. - 2012. - 2 (1 – 2). – 214 с.
103. Шпынов С. Н., Рудаков Н. В., Гранитов В. М. и др. Выявление альфа1-протеобактерий в иксодовых клещах и образцах от больных в России // Омский научный вестник. - 2006. - N 3. - с. 32-37.
104. Шпынов С. Н., Рудаков Н. В., Самойленко И. Е. и др. Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза // Журнал микробиологии,

- эпидемиологии и иммунологии: Двухмесячный научно-практический журнал. — 2004. — N 5 . — с. 4.
105. Щучинова Л.Д., Козлова И.В., Злобин В.И. Ведущая роль клещей рода *Dermacentor* в поддержании природных очагов клещевого энцефалита в Республике Алтай // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2013. – 6 (73). – с. 16–19.
  106. Ястребов В.К. Современные тенденции в эпидемиологического процесса трансмиссивных природноочаговых инфекций в Сибири и на Дальнем Востоке // “Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера.” Науч. Конф. тез. докл. (Новосибирск). - 1998. - с. 5-6.
  107. Alekseev AN, Dubinina HV, Antykova LP, Dzhivanyan TI, Rijpkema SG, Kruif NV, Cinco M. Tick-borne borreliosis pathogen identification in Ixodes ticks (Acarina, Ixodidae) collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia // J. Med. Entomol. - 1998. - 35(2). – с. 136-42.
  108. Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds // J. Med. Entomol. - 2001. - 38(4). – с. 471–474.
  109. Amerasinghe FP, Breisch NL, Azad AF, et al Distribution, density, and Lyme disease spirochete infection in Ixodes dammini (Acari: Ixodidae) on white-tailed deer in Maryland // J Med Entomol. - 1992. - 29(1). - 54-61.
  110. Anda P, Backenson PB, Coleman JL, Benach JL. Epitopes shared by unrelated antigens of *Borrelia burgdorferi* // Infect Immun. - 1994. - 62(3). – с. 1070-8
  111. Anderson, J. F. Epizootiology of Lyme borreliosis // Scand. J. Infect. Dis. - 1991.- Suppl. 77. - с. 23-34.
  112. Angelov LL, Rakajeva TA, Gancheva TR, et al. 1996. Non-transmission mechanism of infection in Lyme borreliosis.// VII Int. Congr. Lyme borreliosis. San Francisco. California. 1996.- Abstracts. P.112.

113. Anthoissen FM, M. De Kesel, PP Hoet, GH Bigaignon. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium // *Res. Microbiol.* - 1994. - 145. – c. 327-331.
114. Artsob H., Garvie M., Cawthorn RJ et al. Isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from *Ix. dammini* (Acari: Ixodidae) collected at Prince Edward Island, Canada // *J.Med.Entomol.* - 1992. - Vol.29, №6. - c. 1063-1066.
115. Assous M, Postic D, Baranton G. Clinical and epidemiological implications of *Borrelia burgdorferi* sensu lato taxonomy // In: Y. Yanagihara, T. Masuzawa (ed.), “Proceeding of the International Symposium on Lyme Disease in Japan”. - c.148-162.
116. Assous M, Postic D, Paul G, Nevot P, Baranton G. Western blot analysis of sera from LB patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* - 1993. - 12(4). – c. 261-8.
117. Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. // *Res Microbiol.* - 1995. - 146(4). – c. 329-40.
118. Baranton G, Assous M, Postic D. [Three bacterial species associated with Lyme borreliosis. CLinical and diagnostic implications] // *Bull Acad Natl Med.* 1992. - 176(7). – c. 1075-85. French.
119. Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous, and P. A. Grimont. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1992.- 42. – c. 378-383.
120. Barbour A. G., Heiland R. A., and Howe T. R. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates // *J. Infect. Dis.* - 1985.- 152. – c. 478-484.
121. Barbour A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes // *Yale J Biol Med.* - 1984. - 57(4). – c. 521-5.

122. Barbour A.G. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent // J.Clin.Microbiol. 1988. – 26. – c.475–478.
123. Barbour A.G., Hayes S. F. Biology of *Borrelia* species // Microbiol. Rev. – 1986. – 50. – 381. – 400c.
124. Baumgarten B.U., Rollinghoff M., Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany // J Clin Microbiol. - 1999. - 37(11). – c. 3448-51.
125. Belfaiza, J., D. Postic, E. Bellenger, G. Baranton, and I. Saint Girons. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis // J. Clin. Microbiol. – 1993. - 31. – c. 2873-2877.
126. Belfaiza, J., Postic, D., and G. Baranton. 1994. Molecular fingerprinting and phylogeny of *Borrelia burgdorferi* sensu lato // In: Y. Yanagihara, and T. Masuzawa (ed.), Proceeding of the International Symposium on Lyme Disease in Japan. - 1994. - p. 133-147.
127. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, Leonova GN. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties // PLoS One. – 2014. - 16;9(4). - e94946.
128. Bhide M.R., Travnicek M., Levkutova M., Curlik J., Revajova V., Levkut M. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2005. – 43(2). – c. 165-72.
129. Biernat B., Karbowiak G., Werszko J. et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland // Exp. Appl. Acarol. – 2014. – N 64(4). – c. 543-551.
130. Boye K, Hogdall E, Borre M. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers // Microbiol Res. - 1999.- 154(1). – c. 23-6.
131. Brei B., J. S. Brownstein, J. E. George, J. M. Pound, J. A. Miller, T. J. Daniels, R. C. Falco, K. C. Stafford, III, T. L. Schulze, T. N. Mather, J. F. Carroll, and D. Fish. Evaluation of the United States Department of Agriculture

- Northeast Area-Wide Tick Control Project by Meta-Analysis // Vector-borne and zoonotic diseases. - 2009. – 9(4). – c. 423-430.
132. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation // *Embo J.* – 2004. - 23. – c. 728-738.
133. Bretz AG, Ryffel K, Hutter P, Dayer E, Peter O. Specificities and sensitivities of four monoclonal antibodies for typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates // *Clin Diagn Lab Immunol.* - 2001.- 8(2). – c. 376-84.
134. Bunikis J, Noppa L, Ostberg Y, Barbour AG, Bergstrom S. Surface exposure and species specificity of an immunoreactive domain of a 66-kilodalton outer membrane protein (P66) of the *Borrelia* spp. that cause Lyme disease // *Infect Immun.* - 1996. - 64. – c. 5111–5116.
135. Busch U., Hizo-Teufel C., Boehmer R., Fingerle V., Nitschko H., Wilske B., Preac-Mursic V. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – 34. – c. 1072-1078.
136. Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton, and D. Postic. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1993. – 25. – c. 441-448.
137. Casjens S, et al. A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* // *Mol Microbiol.* – 2000. - 35. – c. 490–516.
138. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe // *Clin Microbiol Infect.* - 2004. - 10. – c. 1040–55.
139. Chen T, Ka-Kit Leung R, Liu R, Chen F, Zhang X, Zhao J, Chen S. Risk of imported Ebola virus disease in China // *Travel Med Infect Dis.* – 2014. – 12(6 Pt A). – c. 650-8.



140. Choi B.C., Pak A.W. A simple approximate mathematical model to predict the number of severe acute respiratory syndrome cases and deaths // *J Epidemiol Community Health*. – 2003. – 57(10). – c. 831-5.
141. Christen, H. J., F. Hanefeld, H. Eiffert, and R. Thomssen.. Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis.// *Acta Paediatr. Suppl*. - 1993. - 386. – c. 1-75.
142. Chu CY, Jiang BG, Liu W, Zhao QM, Wu XM, Zhang PH, Zhan L, Yang H, Cao WC. Presence of pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and rodents in Zhejiang, south-east China // *J Med Microbiol*. 2008.- 57(Pt 8). – c. 980-5.
143. Chu P.W., Westaway E.G. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication // *Virology*. - 1985. – 140(1). – c. 68–79.
144. Chu, J.J.H., Ng, M.L., 2004a. Infectious entry of West Nile Virus occurs through clathrinmediated endocytic pathway // *J. Virol*. 78 (19), 10543–10555.
145. Chunikhin SP, Kurenkov VB. Viraemia in *Clethrionomys glareolus* -- a new ecological marker of tick-borne encephalitis virus // *Acta Virol*. - 1979. - 23(3). – c. 257-60.
146. Cimmino, M.A. Relative frequency of Lyme borreliosis of its clinical manifestations in Europe // *Infection*. - 1998. – 26. – c. 298-300.
147. Clover JR, Lane RS Evidence implicating nymphal *Ixodes pacificus* (Acari: ixodidae) in the epidemiology of Lyme disease in California // *Am J Trop Med Hyg*. – 1995. - 53(3). – c. 237-40.
148. Coipan E.C., Fonville M., Tjisse-Klasen E., van der Giessen J.W., Takken W., Sprong H., Takumi K. Geodemographic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato using the 5S-23S rDNA spacer region // *Infect Genet Evol*. – 2013. – 17. – c. 216-22.
149. Corver J., Ortiz A., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X., Wilschut J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant

- subviral particles in a liposomal model system // *Virology*. - 2000. – 269. – с. 37–46.
150. Crippa M, Rais O, Gern L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks // *Vector Borne Zoonotic Dis.* - 2002. - 2(1). – с. 3-9.
  151. Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China // *Emerg Microbes Infect.* - 2018. - 7(1). – с. 74.
  152. Diekmann O., Heesterbeek J. A. P., Metz J. A. J. On the definition and the computation of the basic reproduction ratio  $R_0$  in models for infectious diseases in heterogeneous populations // *Journal of Mathematical Biology*. – 1990. – 28 (4). – с. 365–382.
  153. Doby JM, Chevrier S., Covatarmanach A. La spirochetose a tignes par *Borrelia burgdorferi* chez les chenes dans Louset de la France // *Rec. Med. Vet.* - 1988. – 164(5). – с. 365-377.
  154. Donoso-Mantke O., Karan L.S., Růžek D. Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview [Электронный ресурс] // Daniel Růžek. *Flavivirus Encephalitis*. - IntechOpen. - 2011. - Режим доступа: [<https://www.intechopen.com/books/flavivirus-encephalitis/tick-borne-encephalitis-virus-a-general-overview>].
  155. Dressler F, Ackermann R, Steer AC. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis // *J. Infect. Dis.* – 1994. – 169. – с. 313-318.
  156. Dunning H.J.C., Lin M., Madupu R., et al. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents // *PLoS Genet.* - 2006. - 2(2). - e21.
  157. Dykhuizen D.E., Polin D.S., Dunn J.J., Wilske B., Preac-Mursic V., Dattwyler R.J., Luft B.J. *Borrelia burgdorferi* is clonal: Implications for taxonomy and vaccine development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – 90. – с. 10163-10167.

158. Ebani V.V., Rocchigiani G., Bertelloni F., Nardoni S., Leoni A., Nicoloso S., Mancianti F. Molecular survey on the presence of zoonotic arthropod-borne pathogens in wild red deer (*Cervus elaphus*) // *Comp Immunol Microbiol Infect.* – 2016. – 47. – c. 77-80.
159. Ecker M., Allison S., Meixner T., Heinz F. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // *Journal of General Virology.* – 1999. - 80. – c. 179–185.
160. Egyed L., Zöldi V., Szeredi L. Subclinical Tick-Borne Encephalitis Virus in Experimentally Infected *Apodemus agrarius* // *Intervirology.* – 2015. – 58(6). – c. 369-72.
161. Ernek E., Kozuch O., Nosek J. The relation between tick borne encephalitis virus and the wild duck *anas platyrhynchos* part 2 chronic latent infection // *Acta Virologica.* – 1969. – 13(4). – c. 303-308.
162. Fajs L, Durmiši E, Knap N, Strle F, Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia // *PLoS One.* – 2012. – 7(11). – e48420.
163. Fish D., Dowles R.S., Host associations of ticks (Acari: Ixodidae) parasiting medium-sized mammals in a Lyme disease endemic area of southern New York.// *J Med Entomol.* 1989 May.- 26(3):200-9.
164. Fisman D, Khoo E, Tuite A. Early epidemic dynamics of the west african 2014 ebola outbreak: estimates derived with a simple two-parameter model // *PLoS Curr.* – 2014. – 6.
165. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. Et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* // *Nature.* - 1997.- 390. – c. 580-586.
166. Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y., Matsushita O, Ralph D, McClland M, Nakao M. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the tick *Ixodes persulcatus*, the vector of the Lyme disease in Japan // *Int.J.Syst. Bacteriol.* - 1995.- 45. – c. 804-810.

167. Fukunaga M.<sup>1</sup>, Hamase A, Okada K et al. Chracterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *I. turdus* and *I. columnae* and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato strains // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – c. 2338-2344.
168. Fukunaga M.<sup>2</sup>, Hamase A., Okada K., Nakao M.. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis // *Microbiol. Immunol.* - 1996.- 40. – c. 877-881.
169. Fukunaga M.<sup>3</sup>, Okada K., Nakao M. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on Flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme Disease *Borreliae* // *Int.J.Syst.Bacteriol.* – 1996. – c. 898-905.
170. Fukunaga M.<sup>4</sup>, Koreki Y., A phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato isolates associated with Lyme disease in Japan by Flagellin gene sequence determination // *Int J Sys Bacteriol.* – 1996. - (46)2. – c. 416-421.
171. Fukunaga M., Sohnaka M., Yanagihara Y.. Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism // *J. Gen. Microbiol.* - 1993. – 139. – c. 1141-1146.
172. Fukunaga, M., Y. Yanagihara, and M. Sohnaka. The 23S/5S ribosomal RNA genes (rrl/rrf) are separate from the 16S ribosomal RNA gene (rrs) in *Borrelia burgdorferi*, the aetiological agent of Lyme disease // *J. Gen. Microbiol.* - 1992. – 138. – c. 871-877.
173. Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K., Dzhivanian T.I., Gould E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography // *J Gen Virol.* – 2001. - 82(Pt 8). – c. 1867-7.
174. Gern L., Rats O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari:ixodidae) // *J. Med. EntomoL* 1996. – 33. – c. 189-192.

175. Golovljova I., Vene S., Sjolander K.B., Vasilenko V., Plyusnin A., Lundkvist Å. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia // *J Med Virol.* – 2004. – 74. – c. 580–8.
176. Golovljova I., Katargina O., Geller J., Tallo T., Mittzenkov V., et al. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype // *Int J Med Microbiol.* - 2008. – 298(S1). – c. 108-120.
177. Gorelova N.B., Postic D., Korenberg E.I., et al. 1996. *Borrelia* genospecies mixture in ticks and small mammals from natural foci // VII Int. Congr. Lyme borreliosis. San Francisco. California. - 1996.- Abstracts. - c. 20.
178. Gorelova, N. B., Korenberg, E. I., Postic, D., Iunicheva, I. V., Riabova T.E. The first isolation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in Russia // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* - 2001. - №4. – c. 10-12.
179. Grandstorm M. Tick-borne zoonoses in Europe // *J.Clin.Microbiol. and Infection.* - 1997.- 3(2). - c. 156-169.
180. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA, de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // *Virology.* - 2007. - 361(1). – c. 80-92.
181. Gritsun T. S., Frolova T. V., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Venugopal K., Gould E. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses // *Virus Research.* - 1993. - 27. – c. 201-209.
182. Gritsun T. S., Frolova T. V., Zhankov A. I., Armesto M., Turner S. L., Frolova M. P., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A.. Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne encephalitis // *Journal of Virology.* - 2003. - 77(1). – c. 25–36.
183. Gritsun T.S., Desai A., Gould E.A. The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations // *J Gen Virol.* – 2001. – 82. – c. 1667-1675.

184. Gritsun T.S., Frolova T.V., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Venugopal K., Gould E.A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses // *Virus Res.* - 1993. - 27(2). – c. 201-9.
185. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., et al. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis // *J Virol.* – 2003. – 77. – c. 25-36.
186. Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis // *Virus Research.* – 1995. – 35. – c. 307-321.
187. Gritsun T.S., Gould E.A. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy // *J Virol Methods.* – 1998. - 76(1-2). – c. 109-20.
188. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis // *Antiviral Res.* - 2003. - 57(1-2). – c. 129-46.
189. Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe // *Parasitology.* - 2003. - 126(Pt 1). – c. 11-20.
190. Hanincová K, Taragelová V, Koci J, Schäfer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia // *Appl Environ Microbiol.* – 2003. - 69(5). – c. 2825-30.
191. Hartemink N.A., Randolph S.E., Davis S.A., Heesterbeek J.A. The basic reproduction number for complex disease systems: defining  $R(0)$  for tick-borne infections // *Am Nat.* – 2008. – 171(6). – c. 743-54.
192. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe.// *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998 Jul;5(4):456-62.

193. Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus // *J Gen Virol.* – 2004. - 85(Pt 4). – c. 1007-18.
194. Hayasaka D, Ivanov L, Leonova GN, Goto A, Yoshii K, et al. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia // *J Gen Virol.* – 2001. – 82. – c. 1319-1328.
195. Hayes S.F., Burgdorfer W. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* // In: *Aspects of Lyme borreliosis*, Weber K., Burgdorfer W (Eds.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. - 1993. - c. 29-43.
196. He J., неопубл., 2005
197. Heffernan JM, Smith RJ, Wahl LM. Perspectives on the basic reproductive ratio. Review // *J R Soc Interface.* – 2005. – 2(4). – c. 281-93.
198. Heinz F.X., Allison S.L. Flavivirus structure and membrane fusion // *Adv Virus Res.* – 2003. – 59. – c. 63–97.
199. Heinz FX, Holzmann H, Essl A, Kundi M. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis // *Vaccine.* – 2007. - 25(43). – c. 7559-67.
200. Hendson M, Lane RS Genetic characteristics of *Borrelia coriaceae* isolates from the soft tick *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) // *J Clin Microbiol.* – 2000. - 38(7). – c. 2678-82.
201. Hofmann H, Kunz C, Heinz FX, Dippe H. Detectability of IgM antibodies against TBE virus after natural infection and after vaccination // *Infection.* - 1983. – 11. – c. 164–6.
202. Hope M, Menzies M, Kemp D. Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). // *J Econ Entomol.* – 2010. - 103(4). – c. 1355-9.
203. Hopp T.P. and Woods K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences // *Proc Natl Acad Sci.* – 1981. – 78. – c. 3824.

204. Hovius K.E., Stark L.A.M., Bleumink-Pluym N.M.C., et al. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction // *Veterinary Quarterly*. - 1999.- 21(2). - с. 54-58.
205. eLibraryRU Электронная библиотека. [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: [<http://elibrary.ru/>].
206. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/> - электронная страница Центра по контролю над заболеваниями (CDC) США.
207. GenBank, электронная база данных. [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>].
208. PubMed, электронная база данных. [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>]
209. Hu C.M., Leuba-Garcia S., Kramer M.D., Aeschlimann A., Gern L. Comparison in the immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes ricinus* derived from three endemic areas in Switzerland // *Epidemiol Infect* . - 1994. - 112(3). – с. 533-42.
210. Hu C.M., Gern L., Aeschlimann A.. Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks // *Parasite Immunol*. - 1992.- 14. – с. 415-427.
211. Hubalek, Z., and J. Halouzka. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review // *Eur. J. Epidemiol*. - 1997. – 13. – с. 951-957.
212. Hudson BJ, Stewart M, Lennox VA, Fukunaga M, Yabuki M, Macorison H, Kitchener-Smith J. Culture-positive Lyme borreliosis // *Med.J.Aust*. – 1998 .- 168(10). – с. 500-502.
213. Hulinska D, Votypka J, Valesova M. Persistence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in patients with Lyme arthritis // *Zentralbl Bakteriол*. - 1999. - 289(3). – с. 301-18.



214. Humair, P. F., D. Postic, R. Wallich, and L. Gern. An avian reservoir (Turdus merula) of the Lyme borreliosis spirochetes // Zentbl. Bakteriol. - 1998. - 287. - c. 521-538.
215. Inayoshi M., Naitou H., Kawamori F., Masuzawa T., Ohashi N. Characterization of Ehrlichia species from Ixodes ovatus ticks at the foot of Mt.Fuji, Japan.// Microbiol. Immunol. - 2004. - 48(10). – c. 737-745.
216. Index of Viruses - Flaviviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm)
217. Ishiguro F, Takada N, Masuzawa T, Fukui T. Prevalence of Lyme disease Borrelia spp. in ticks from migratory birds on the Japanese mainland // Appl Environ Microbiol. - 2000. - 66(3) - c. 982-6.
218. Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfrey HP, Cabello FC. Borrelia chilensis, a new member of the Borrelia burgdorferi sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere // Environ Microbiol. - 2014. - 16(4). – c. 1069-80.
219. Jaenson T.G.T., Petersson E.H., Jaenson D.G.E., Kindberg J., Pettersson J.H., Hjertqvist M., Medlock J.M., Bengtsson H. The importance of wildlife in the ecology and epidemiology of the TBE virus in Sweden: incidence of human TBE correlates with abundance of deer and hares // Parasit Vectors. – 2018. – 11(1) – c. 477.
220. Jauris-Heipke S, Fuchs R, Hofmann A, Lottspeich F, Preac-Mursic V, Soutschek E, Will G, Wilske B. Molecular characterization of the p100 gene of Borrelia burgdorferi strain PKo // FEMS Microbiol Lett. - 1993. - 114(2). – c. 235-41
221. Jemeršić L., Deždek D., Brnić D., Prpić J., Janicki Z., Keros T., Roić B., Slavica A., Terzić S., Konjević D., Beck R. Detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (Vulpes vulpes) and isolated from spleen samples of red

- deer (*Cervus elaphus*) in Croatia // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2014. - 5(1). – c. 7-13.
222. Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1984. - 34. – c. 496-497.
223. Jones LD, Davies CR, Steele GM, Nuttall PA. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviraemic host // *Science.* - 1987. - 237. – c. 775–7.
224. Jones LD, Gaunt M, Hails RS, Laurenson K, Hudson PJ, et al. Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares.// *Medical Veterinary Entomology.* - 1997. - 11. – c. 172-176.
225. Junttila J., Tanskanen R, Tuomi J. Prevalence of *B. burgdorferi* in selected tick populations in Finland // *Scand. J. Infect. Dis.* - 1994. - 26, №3. - c. 349-355.
226. Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994–98: a prospective study of 656 patients // *Brain* 1999. – 122. – c. 2067–78.
227. Karabatsos N. (Ed.). *International Catalogue of Arboviruses. Including certain other viruses of vertebrates.* 3rd ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1985. – c. 2067-78.
228. Khan A, Naveed M, Dur-E-Ahmad M, Imran M. Estimating the basic reproductive ratio for the Ebola outbreak in Liberia and Sierra Leone // *Infect Dis Poverty.* – 2015. – 4. – c.13.
229. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *Journal of Molecular Evolution.* - 1980. - 16. – c. 111-120.
230. Kiskowski MA. A three-scale network model for the early growth dynamics of 2014 west Africa ebola epidemic // *PLoS Curr.* – 2014. – 6.
231. Klafke GM, de Albuquerque TA, Miller RJ, Schumaker TT. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil // *Vet Parasitol.* - 2010. - 168(1-2). – c. 97-104.

232. Knap N., Korva M., Dolinšek V., Sekirnik M., Trilar T., Avšič-Županc T. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2012. – 12(3). – c. 236-42.
233. Kocan KM, de la Fuente J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale* // *Vet Parasitol.* - 2003. - 112(4). – c. 295-305.
234. Kopecký J, Grubhoffer L, Kovár V, Jindrák L, Vokurková D. A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affinoblotting // *Intervirology.* - 1999. - 42(1). – c. 9-16.
235. Kopecky J., Tomkova E., Vlcek M. Immune response of the long tailed field mouse (*Apodemus sylvaticus*) to tick-borne encephalitis virus infection // *Folia Parasitol.* – 1991. – 38. – c. 275–282.
236. Korenberg E.I, Kovalevskii Yu.V. A Model for Relationships among the Tick-Borne Encephalitis Virus, Its Main Vectors, and Hosts // Chapter in: *Advances in Disease Vector Research.* – 1994. – Vol 10. – c. 65-92.
237. Korenberg E.I. Problems in the study and prophylaxis of mixed infections transmitted by ixodid ticks // *Int J Med Microbiol.* - 2004. - 293 Suppl 37. – c. 80-5.
238. Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history // *Infect Genet Evol.* - 2017. – c. 159-165.
239. Kovalev SY, Chernykh DN, Kokorev VS, Snitkovskaya TE, Romanenko VV. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries // *J Gen Virol.* - 2009. - 90(Pt 12). – c. 2884-92.
240. Kovalev SY, Mukhacheva TA. Clusteron structure of tick-borne encephalitis virus populations // *Infect Genet Evol.* 2013. 14:22-8.
241. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivanian T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* – 2010. – 398(2). – c. 262-72.

242. Kožuch, O., Grešíková, M., Nosek, J., Lichard, M., Sekeyová, M. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis // Bull. World Health Organ. - 1967. - 36(Suppl 1). – c. 61-6.
243. Kraiczy P., Acker G., Brade V. Characteristics of the pathogen // In: Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, V. Brade. Bremen, Germany. - 1999. - c. 20-30.
244. Kraiczy P., Hunfeld KP, Breitner-Ruddock S, Würzner R, Acker G, Brade V. Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates // Immunobiology. - 2000. - 201(3-4). – c. 406-19.
245. Kroschewski H., Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus // Virology. - 2003. - 308(1). – c. 92-100.
246. Kunz C. TBE vaccination and the Austrian experience // Vaccine. – 2003. – 21 Suppl 1. – c. 50-5.
247. Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., Schäfer S.M., Sewell H.S., Brade V., Kraiczy P. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement // Trends Microbiol. – 2002. – 10(2). – 74-9.
248. Kurtenbach K., Peacey M., Sjoerd G., Rijpkema T., Hoodless A.N., Nuttall P.A., Randolph S.E. Differential Transmission of the Genospecies of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato by Game Birds and Small Rodents in England // Appl Environ Microbiol. – 1998. – Vol. 64, No. 4. – c. 1169-1174.
249. Labuda M., Austyn J.M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P.A. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission // Virology. – 1996. – 219. – c. 357-366.
250. Labuda M., Jones L.D., Williams T., Danielova V., Nuttall P. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks // J. Med. Entomol. 1993. – 30. – c. 295-299.

251. Labuda M., Jones L.D., Williams T., Nuttall P. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts // Med. Vet. Entomology. – 1993. – 7. – c. 193-196.
252. Labuda M., Kozuch O., Zuffova E., Eleckova .E, Hails R.S., Nuttall P.A. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural hosts // Virology. – 1997. – 235. – c. 138-143.
253. Labuda, M., W. R. Jiang, M. Kaluzova, O. Kozuch, P. A. Nuttall, P. Weismann, E. Eleckova, E. Zuffova, and E. A. Gould. Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. Virus Res. – 1994. – 31. - 305-15.
254. Lane RS, Piesman J, Burgdorfer W. Lyme borreliosis relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe // Annu. Rew. Entomol. - 1991. - Vol.36. - c. 587-609.
255. Lawrence RH, Bradburi R, Cullin JS. Lyme disease on the NSW central coast [letter] // Med.J.Aust. 1986. – 145. – c. 364.
256. Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Peter, and G. Baranton. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - 47. – c. 921-925.
257. Lebech AM, Hansen K, Wilske B, Theisen M. Taxnomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five diferent phenotypic and genotyping schemes // Med.Microbiol.Immunol.(Berlin). - 1994. - 183(6). – c. 325-41.
258. Lee SH, Kim BJ, Kim JH, Park KH, Yeo SJ, Kim SJ, Kook YH Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from Korea by 16S rDNA sequence analysis and PCR-RFLP analysis of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons // Int J Syst Evol Microbiol. - 2000. - 50 Pt 2. – c. 857-63.
259. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains

- isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East // *Virology*. – 2013. – 443(1). – c. 89-98.
260. Leonova G.N., Ternovoi V.A., Pavlenko E.V. et al. Evaluation of vaccine Encepur Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus // *Vaccine*. – 2007. – 25(5). – c. 895–901.
  261. Lesnyak O, Laikovakaya E, Kufko I, et al. Clinical features of Lyme borreliosis in the middle Urals and distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in local *Ixodes persulcatus* ticks // *Zentralbl. Bakteriologie*. – 1998. – 288(1). – c. 111-9.
  262. Liang, J. G., and Z. F. Zhang. Analysis of rRNA gene restriction fragment length polymorphism of *B. burgdorferi sensu lato* isolated in China // *Chin. J. Microbiol. Immunol.* - 1996.- 16. – c. 359-362.
  263. Liebisch, G., B. Sohns, and W. Bautsch.. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR // *J. Clin. Microbiol.* - 1998.- 36. - c. 3355-3358.
  264. Lindenbach B.D., Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses // *Adv Virus Res.* - 2003. - 59. – c. 23–61.
  265. Lindenbach B.D., Thiel H.-J., Rice C.M.. “Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.” Chapter 33 // In: D.M. Knipe, et al. (eds.), *Fields Virology*, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, NY. - 2006. – c. 1101-1133.
  266. Lipsitch M., Cohen T., Cooper B., Robins J.M., Ma S., James L., Gopalakrishna G., Chew S.K., Tan C.C., Samore M.H., Fisman D., Murray M. Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome // *Science*. – 2003. – 300(5627). – c. 1966-70.
  267. Liveris, D., A. Gazumyan, and I. Schwartz. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis // *J. Clin. Microbiol.* - 1995. - 33. – c. 589-595.
  268. Liveris, D., S. Varde, R. Iyer, S. Koenig, S. Bittker, D. Cooper, D. McKenna, J. Nowakowski, R. B. Nadelman, G. P. Wormser, and I. Schwartz.

- Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* - 1999.- 37. – c. 565-569.
269. Lorenz I., Allison S., Heinz F., Helenius A. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum // *Journal of virology.* - 2002. - c. 5480–5491.
  270. Luft B.J., Mudri S., Jiang W., Dattwyler R.J., Gorevic P.D., Fischer T., Munoz P., Dunn J.J., Schubach W.H. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen // *Infect Immun.* - 1992. - 60(10). – c. 4309-21.
  271. Lundkvist K, Vene S, Golovljova I, Mavtchoutko V, Forsgren M, Kalnina V, et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes // *J Med Virol.* - 2001. - 65. – c. 730–5.
  272. Magnarelli LA, Anderson JF, Ticks and biting insects infected with etiologic agent of Lyme disease *Borrelia burgdorferi* // *J Clin Microbiol.* - 1988. - Vol 26. №8. – c. 1482-1486.
  273. Magnarelli, L.A. Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease // *Am. J. Med.* - 1995.- 98. - 10S-12S.
  274. Magnarelli, L.A., JMiller.N., Anderson J.F., Riviere G.R.. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease // *J. Clin. Microbiol.* - 1990.- 28. – c. 1276-1279.
  275. Maldov DG, Karganova GG, Timofeev AV. Tick-borne encephalitis virus interaction with the target cells // *Arch Virol* 1992. – 127. – c. 321–325.
  276. Mandl C.W., Holzmann H., Meixner T., Rauscher S., Stadler P.F., Allison S.L., Heinz F.X. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus // *J Virol.* - 1998. - 72(3). – c. 2132-40.
  277. Mandl, C. W., H. Kroschewski, S. L. Allison, R. Kofler, H. Holzmann, T. Meixner, and F. X. Heinz.. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-

- 21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo // J Virol. - 2001 - 75. – c. 5627-37.
278. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis // J Gen Virol. 2009. – 90(Pt 8). – c. 1781-94.
279. Mantke O.D., Schadler R., Niedrig M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries // Eurosurveillance. – 2008. - 13(17). - pii=18848.
280. Marconi, R. T., D. Liveris, and I. Schwartz. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates // J. Clin. Microbiol. - 1995. - 33. – c. 2427-2434.
281. Marconi, R. T., L. Lubke, W. Hauglum, and C. F. Garon.. Species-specific identification of and distinction between *Borrelia burgdorferi* genomic groups by using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes // J. Clin. Microbiol. - 1992. - 30. – c. 628-632.
282. Margos G, Gatewood AG, Aanensen DM, Hanincová K, Terekhova D, Vollmer SA, Cornet M, Piesman J, Donaghy M, Bormane A, Hurn MA, Feil EJ, Fish D, Casjens S, Wormser GP, Schwartz I, Kurtenbach K. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi* // Proc Natl Acad Sci USA. - 2008. - 105(25). – c. 8730-5.
283. Margos G, Piesman J, Lane RS, Ogden NH, Sing A, Straubinger RK, Fingerle V. *Borrelia kurtenbachii* sp. nov., a widely distributed member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato species complex in North America // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - 64(Pt 1). – c . 128-30.
284. Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A



- new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes // *Appl Environ Microbiol.* - 2009. - 75(16). – c. 5410-6.
285. Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato // *Infect Genet Evol.* – 2011. - 11(7). – c. 1545-63.
286. Margos G., Wilske B., Sing A., Hizo-Teufel C., Cao W.C., Chu C., Scholz H., Straubinger R.K., Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2013. - 63(Pt 11). – c. 4284-8
287. Martin C. J. Maiden, Jae A. Bygraves, Edward Feil, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms // *Microbiology.* - 1998. - Vol. 95, Issue 6 - c. 3140-3145.
288. Masuzawa, T., Naumov, R. L., Kudiken, M., Kharitononkov, I. G. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in the Moscow region, Russia // *Med Parazitol (Mosk).* - 2001. - 2. – c. 52.
289. Masuzawa T, Fukui T, Miyake M, Oh HB, Cho MK, Chang WH, Imai Y, Yanagihara Y. Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana* // *Int J Syst Bacteriol.* - 1999. - 49 Pt 4. – c. 1409-15.
290. Masuzawa T, Pan MJ, Kadosaka T, Kudiken M, Takada N, Yano Y, Imai Y, Yanagihara Y. Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen Islands // *Microbiol Immunol.* 2000. - 44(12). – c. 1003-9.
291. Masuzawa T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. // *Jpn J Infect Dis.* 2004. - 57(6). – c. 229-35.
292. Masuzawa T., Wilske B., Komikado T., Suzuki H., Kawabata H., Sato N., Muramatsu K., Sato N., Isogai E., Isogai H., Johnson R.C., Yanagihara Y. Comparison of OspA serotypes for *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Japan, Europe and North America // *Microbiol Immunol.* - 1996. - 40(8). – c. 539-45.

293. Masuzawa T2, Pan MJ, Kadosaka T, Kudeken M, Takada N, Yano Y, Imai Y, Yanagihara Y. Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen Islands // *Microbiol Immunol.* – 2000. - 44(12). – c. 1003-9.
294. Masuzawa, T., A. Iwaki, Y. Sato, K. Miyamoto, E. I. Korenberg, and Y. Yanagihara. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in far eastern Russia // *Microbiol. Immunol.* - 1997. - 41. – c. 595-600.
295. Masuzawa, T., H. Suzuki, H. Kawabata, F. Ishiguro, N. Takada, Y. Yano, and Y. Yanagihara. Identification of spirochetes isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica* // *J. Clin. Microbiol.* - 1995.- 33. – c. 1392-1394.
296. Masuzawa, T., T. Komikado, K. Kaneda, T. Fukui, K. Sawaki, and Y. Yanagihara. Homogeneity of *Borrelia japonica* and heterogeneity of *Borrelia afzelii* and '*Borrelia tanukii*' isolated in Japan, determined from *ospC* gene sequences // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1997.- 153 - c. 287-293.
297. Mathiesen, D. A., J. H. Oliver, Jr., C. P. Kolbert, et al. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States // *J. Infect. Dis.* - 1997. - 175. – c. 98-107.
298. Mediannikov O.Y., Ivanov L.I., Zdanovskaya N., Vorobyova R., Sidelnikov Y., Fournier P.E., Tarasevich I., Raoult D. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russian Far East // *Microbiol. Immunol.* – 2005. - 49(3). – c. 191-197.
299. Mickiene A, Laiskonis A, Günther G, Vene S, Lundkvist A, Lindquist L. Tick-borne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis // *Clin Infect Dis.* – 2002. – 35. – c. 650–58.
300. Misonne M. C., and P. P. Hoet. Species-specific plasmid sequences for PCR identification of the three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involved in Lyme disease // *J. Clin. Microbiol.* - 1998.- 36. – c. 269-272.
301. Mukhacheva TA, Kovalev SY. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Russia // *Ticks Tick Borne Dis.* - 2013. - 4(4). – c. 275-9.

302. Nadelman RB, Nowakowski J, Forester G, Goldberg NS, Bittker S, Cooper D, Agüero-Rosenfeld M, Wormster GP. The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans // *Am.J.Med.* – 1996. – 100. – c. 502-508.
303. Nadelman RB1, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, Welch P, Marcus R, Agüero-Rosenfeld ME, Dennis DT, Wormser GP, Tick Bite Study Group. Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an Ixodes scapularis tick bite // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345. – c. 79–84.
304. Nakao M, Miyamoto K, Uchikawa K et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from *I. persulcatus* and *I. ovatus* ticks in Japan // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 1992.- 47(4). - c. 505-511.
305. Nakao M., Miyamoto K. Susceptibility of *I. persulcatus* and *I. ovatus* to Lyme disease spirochetes isolated from humans in Japan // *G. Med. Entomol.*, 1994. - 31. - №3. - c. 467-473.
306. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevskii Y.V. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus* // *Folia Parasitol (Praha)*. – 2004. - 51(1). – c. 67-71.
307. Nosek J., Kožuch O, Grulich I. The structure of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Central Europe // *Oecologia*. - 1970. - 5(1). – c. 61-73.
308. Nowalk A.J., Gilmore R.D. Jr, Carroll J.A. Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins // *Infect Immun.* – 2006. - 74(7). – c. 3864-73.
309. O`Connel S. Lyme disease in the UK: epidemiology, clinical presentations and diagnosis // *J Med Microbiol.* – 1994. – Vol. 40, №2. – c. 77-78.
310. Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z., Bennett M. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K // *Med.Vet.Entomol.* – 1998. – 12. – c. 423–429.

311. Ogden NH, Nuttall PA, Randolph SE. Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks // *Parasitology*. - 1997. - 115 ( Pt 6). – c. 591-9.
312. Ojaimi C., B.E. Davidson, I. Saint Girons, and I.G. Old. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii* // *Microbiology*. - 1994.- 140. – c. 2931-2940.
313. Oliver, J. H. Lyme borreliosis in the southern United States: a review // *J. Parasitol.* - 1996.- 82. – c. 926-935.
314. Orloski KA, Hayes EB, Campbell GL, Dennis DT Surveillance for Lyme disease--United States, 1992-1998 // *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* - 2000. - 49(3). - 1-11.
315. Osada Y, Saito R, Tomita M. Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5' UTR for translation initiation in various prokaryotes // *Bioinformatics*. - 1999. - 15(7-8). – c. 578-81.
316. Overby A.K., Popov V.L., Niedrig M., Weber F. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles // *J Virol.* - 2010. - 84(17). – c. 8470-83
317. Paddock CD, Sumner JW, Shore GM, et al. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis // *J Clin Microbiol.* - 1997. - 35. – c. 2496–2502.
318. Parola P., Roux V., Camicas J.L., Baradji I., Brouqui P., Raoult D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction // *R Soc Trop Med Hyg.* - 2000. - 94(6). – c. 707-8.
319. Peng T, Wang JL, Chen W, Zhang JL, Gao N, Chen ZT, Xu XF, Fan DY, An J. Entry of dengue virus serotype 2 into ECV304 cells depends on clathrin-dependent endocytosis, but not on caveolae-dependent endocytosis // *Can J Microbiol.* – 2009. - 55(2). – c. 139-45.

320. Perez K., Yeam I., Jahn M.M., Kang B.C. Megaprimer-mediated domain swapping for construction of chimeric viruses // *J Virol Methods*. – 2006. – 135. – c. 254–262.
321. Perng G.C., LeFebvre R.B., Johnson R.C. Further characterization of a potent immunogen and the chromosomal gene encoding it in the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi* // *Infect Immun*. – 1991. - 59(6). – c. 2070-4.
322. Piesman J. Transmission of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) // *Exp. Appl. Acarol*. – 1989. - Vol7. №1. – c. 71-80.
323. Piesman J. Vector competence of ticks for the Lyme disease spirochaete (*Borrelia burgdorferi*) // *I Int. Conf. Tick-Borne pathogens at the host-vector interface: an agenda for research. Proc. and abstracts. Saint Paul. Minnesota U.S.A.* - 1992. – c. 130-134.
324. Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Gori A.V., Michael Y. Kartashov M.Y., Protopopova E.V., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Gheorghita S.D., Burlacu V.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova // *J Vector Borne Dis*. – 2015. – 52. – c. 334–336.
325. Popov VL, Chen SM, Feng HM, et al. Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis* // *J Med Microbiol*. - 1995. - 43. – c. 411–421.
326. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A., Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons // *Int J Syst Bacteriol*. – 1994. - 44(4). – c. 743-52.
327. Postic, D., Ras N. M., Lane R. S., Hendson M., Baranton G. Expanded Diversity among California *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127) // *J Clin Microbiol*. – 1998. – 36 (12). – c. 3497-504.
328. Pretzmann G., Loew J., Radda A. Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Niederösterreich. 3. Mitt.:

- Versuch einer Gesamtdarstellung des Zyklus der FSME im Naturherd // Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. - 1963. – 190. – c. 299–312.
329. Qiu WG, Dykhuizen DE, Acosta MS, Luft BJ. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States.// Genetics – 2002. – 160. – c. 833–849.
330. Radda A., Hofmann H., Pretzmann G. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus // Acta virol. – 1969. – 13(1). – c. 74-7.
331. Ralph, D., D. Postic, G. Baranton, C. Pretzman, and M. McClelland. Species of *Borrelia* distinguished by restriction site polymorphisms in 16S rRNA genes // FEMS Microbiol. Lett. - 1993. - 111. – c. 239-244.
332. Randolph S.E., EDEN-TBD sub-project team. Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe // Euro Surveill. – 2010. – 15(27). – c. 24-31.
333. Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission // Parasitol Today. – 1996. – 12. – c. 472–9.
334. Rastogi M., Sharma N., Singh S.K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein // Virol J. – 2016. – 29(13). – c. 131.
335. Reiner R.C. Jr., Stoddard S.T., Scott T.W. Socially structured human movement shapes dengue transmission despite the diffusive effect of mosquito dispersal // Epidemics. – 2014. – 6. – c. 30-6.
336. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // Nature. - 1995. - 375. – c. 291-298.
337. Richter D, Allgöwer R, Matuschka FR. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the lyme disease spirochete *Borrelia afzelii* // Emerg Infect Dis. - 2002. - 8(12). – c. 1421-5.

338. Rikihisa Y. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis* // *Microbes Infect.* - 1999. – c. 367–376.
339. Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:286–308; Rikihisa Y. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis* // *Microbes Infect.* – 1999. – 1. – c. 367–37.
340. Roessler, D., U. Hauser, and B. Wilske. Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis // *J. Clin. Microbiol.* - 1997. - 35. – c. 2752-2758.
341. Rosef O., Paulauskas A., Radzijeuskaja J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids // *Acta Vet Scand.* – 2009. – 51.– c. 47.
342. Rössler D, Eiffert H, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Preac-Mursic V, Teepe J, Schlott T, Soutschek E, Wilske B. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains // *Med Microbiol Immunol.* - 1995. - 184(1). – c. 23-32.
343. Ruzek D., Bliski B., Gunther G. Tick-borne encephalitis virus // In: *Neuroviral Infections: RNA Viruses and Retroviruses*. Ed. by S.K. Singh and D. Ruzek. CRC Press. - 2013. – 519 c.
344. Ryder JW, Ringer RR, Glaney T. Inability of *I. cookei* and *A. americanum* nymphs to transmit *Borrelia burgdorferi* // *J. Med. Entomol.* - 1992. - Vol.23, №3. – c. 525-530.
345. Saint G.I., Gern L, Gray JS, Guy EC, Korenberg E, Nuttall PA, Rijpkema SG, Schonberg A, Stanek G, Postic D. Identification of *B. burgdorferi* sensu lato species in Europe // *Zentbl. Bakteriол.* – 287. – c. 190-195.
346. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* - 1987. - 4. – c. 406-425.
347. Samoylenko I., Malkova M., Tancev A., Yakimenko V., Rudakov N., Raoult D., Fournier P.E. Detection of  $\alpha$ -proteobacteria in rodents in a steppe-forest zone

- of Western Siberia // *Clinical Microbiology & Infection*. - 2009. - T. 15. № SUPPL. 2. – c. 127-129.
348. Sato, Y., Miyamoto K., Iwaki A., Masuzawa T., Yanagihara Y., Korenberg E. I., Gorelova N. B., Volkov V. I., Ivanov L. I., Liberova R. N. Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in far eastern Russia // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – 62. – c.3887-3889.
349. Sato Y, Konishi T, Hashimoto Y, et al Rapid diagnosis of Lyme disease: flagellin gene - based nested Polymerase Chain Reaction for identification of causative *Borrelia* species // *Int.J.Infect.Dis.* - 1997. - 2. - c. 64-73.
350. Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks // *J Clin Microbiol.* – 1999. – 37(7). – c. 2215-22.
351. Schwan, T.G., Burgdorfer W., Garon C.F. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation // *Infect. Immun.* - 1988. - 56. – c. 1831-1836.
352. Schwartz D.C., Cantor C. R.. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // *Cell.* – 1984. – 37. – c. 67-75.
353. Schwartz J.J., A. Gazumyan, and I. Schwartz. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* // *J. Bacteriol.* - 1992. - 174. – c. 3757-3765.
354. Šenigl F., Grubhoffer L., Kopecky J. Differences in Maturation of Tick-Borne Encephalitis Virus in Mammalian and Tick Cell Line // *Intervirology.* - 2006. - 49. – c. 239–248.
355. Shih CM, Pollack RJ, Telford SR 3rd, Spielman A. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice // *J Infect Dis.* – 1992. - 166(4). – c. 827-31.
356. Shobha Varde, John Beckley, and Ira Schwartz. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes scapularis* in a Rural New Jersey County // *Emerg. Infect. Dis.* - 1998. - 4(1). – c. 97-9.



357. Slovák M, Kazimírová M, Siebenstichová M, Ustaníková K, Klempa B, Gritsun T, Gould EA, Nuttall PA. Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks // *Ticks Tick Borne Dis.* - 2014. - 5(6). – c. 962-9.
358. Sonenshine DE, Ratzlaff RE, Troyer J, et al. *Borrelia burgdorferi* in eastern Virginia: comparison between a coastal and inland locality // *Am J Trop Med Hyg.* - 1995. - 53(2). – c. 123-3334.
359. Stadler K., Allison S., Schalich J., Heinz F. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin // *Journal of virology.* -1997. – c. 8475–8481.
360. Stanek G., Burger I., Hirschl A. et al. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle // *Zbl.Bakteriol., Microbiol. und Hyg. Bd.A.* – 1986. - 263.№1-2. - c. 29-33.
361. Stanek G, Klein J, Bittner R, Glodar D. Isolation of *B. burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. // *N. Engl. J. Med.* – 1989. - 322. – c. 249-252.
362. Steere A. C. Lyme disease // *N. Engl. J. Med.* - 1989.- 263. – c. 201-205.
363. Steere, A. C., Schoen R. T., Taylor E.. The clinical evolution of Lyme arthritis // *Ann. Intern. Med.* - 1987.- 107. – c. 725-731.
364. Stevenson, B., and S. W. Barthold.. Expression and sequence of outer surface protein C among North American isolates of *Borrelia burgdorferi* // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1994.- 124. – c. 367-372.
365. Stiasny K, Heinz FX. Effect of membrane curvature-modifying lipids on membrane fusion by tick-borne encephalitis virus // *J Virol.* – 2004. – 78(16). – c. 8536–8542.
366. Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites // *J Virol.* - 2006. - 80(19). – c. 9557-68.
367. Stiasny K, Koessl C, Heinz FX. Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism // *J Virol.* – 2003. – 77(14). – c.7856–7862.
368. Stiasny K., Heinz F. Flavivirus membrane fusion // *Journal of General Virology.* – 2006. – 87. – c. 2755–2766.

369. Strle, F., R. N. Picken, Y. Cheng, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, E. Ruzic-Sabljic, and M. M. Picken. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis causing by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015 // Clin. Infect. Dis. - 1997. – 25. – c. 273-280.
370. Studier J.A., Keppler K.J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei // Mol. Biol. Evol. - 1988.- 5. – c. 729-731.
371. Sumilo D., Asokliene L., Bormane A., Vasilenko V., Golovljova I., Randolph S.E. Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics // PLoS One. – 2007. – 2(6). – e50.
372. Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines // Vaccine 21 (Suppl 1). - 2003. – c. 19–35.
373. Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Wang HP, Wang JC, Masuzawa T. Lyme disease spirochetes in ticks from northeastern China // J Parasitol. - 1998. - 84(3). – c. 499-504.
374. Takada N., Masuzawa T., Ishiguro F., Fujita H., Kudeken M., Mitani H., Fukunaga M., Tsuchiya K., Yano Y., Ma X-H. Lyme Disease *Borrelia* spp. in Ticks and Rodents from Northwestern China // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. - Vol. 67, No.11. – c. 5161-5165.
375. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol Biol Evol. – 2007. - 24. – c. 1596-1599.
376. Tamura K. and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. - 1993. -10. – c. 512-526.
377. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – 30. – c. 2725-2729.

378. Thomas R.J., Dumler J.S., Carlyon J.A.. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis // *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009. - 7(6). – c. 709–722.
379. Tilly K., Rosa P. A., and Stewart P.E.. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi* // *Infect Dis Clin North Am*. 2008. - 22(2). – c. 217–234.
380. Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S, Tikunov A.Y., Zadora O.V., Glupov V.V., Tikunova N.V. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia // *Infect Genet Evol*. – 2017. – 56. – c. 36-43.
381. Tongeren H.A.E. van. Viraemia and antibody response of the mallard (*Anas platyrhynchos*) to infection with tick-borne encephalitis virus // *Journal of Comparative Pathology*. – 93(4). – c. 521-530.
382. Tonteri E., Jääskeläinen A., Tikkakoski T., Voutilainen L., Niemimaa J., Henttonen H., Vaheri A., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008–2009 // *Emerg Infect Dis*. – 2011. – V.17. №1. – c. 72–75.
383. Tonteri E., Jokelainen P., Matala J., Pusenius J., Vapalahti O. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in moose and deer in Finland: sentinels for virus circulation // *Parasites & Vectors*. – 2016. – 9. – c. 54.
384. Tonteri E., Kipar A., Voutilainen L., Vene S., Vaheri A., Vapalahti O., Lundkvist Å. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*) [Электронный ресурс]. – PLoS One. – 2013. – [Режим доступа]: doi: 10.1371/journal.pone.0081214.
385. Tuomi J., Rantamäki L.K., Tanskanen R., Junttila J. Characterization of Finnish *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and with monoclonal antibodies // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1995. – 33(8). – c. 1989-96.

386. Uspensky I. Ticks as the main target of human tick-borne disease control: Russian practical experience and its lessons // *J Vector Ecol.* 1999. - 24(1). – c. 40-53.
387. van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Ramselaar A.C., Kramer M.D., Dankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis // *Clin. Infect. Dis.* – 1993. – 17. – c. 708-717.
388. Wallner G., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* – 1995. – 213. – c. 169-178.
389. Wang G, van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications // *Clinical Microbiological Reviews.* – 1999. - Vol.12, №4. – c. 633-653.
390. Wang G., van Dam A.P., Le Fleche A., Postic D., Péter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19) // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1997. - 47. – c. 926-932.
391. Wang I.N., Dykhuizen D.E., Qiu W., Dunn J.J., Bosler E.M., Luft B.J. Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto // *Genetics.* – 1999. – 151. – c. 15–30.
392. Wang J., Masuzawa T., Yanagihara Y. Characterization of *Borrelia garinii* isolated from Lyme disease patients in Hokkaido, Japan, by sequence analysis of *OspA* and *OspB* genes // *FEMS Microbiol Lett.* - 1997. - 154(2). – c. 371-5
393. Wang L., Chu C., Yang G., Hao R., Li Z., Cao Z., Qiu S., Li P., Wu Z., Yuan Z., Xu Y., Zeng D., Wang Y., Song H. Transmission characteristics of different students during a school outbreak of (H1N1) pdm09 influenza in China, 2009 // *Sci Rep.* – 2014. – 4. – c. 5982.

394. Wang, G.2, van Dam A.P., Dankert J. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis // J. Clin. Microbiol. - 1999. - 37. – c. 3025-3028.
395. Wayne, L. G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Truper H.G. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1987. – 37. – c. 463-464.
396. Wendelin I., Gasser R., Reisinger E.C. Temperature sensivity of *Borrelia burgdorferi* genotypes a possible reason for distinct clinical manifgestations of Lyme borreliosis // VI Int. Conf. Lyme Borreliosis. - Bologna, Italy,1994. Program u Abstracts.
397. Wengler G., Gross H.J. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses // Virology. – 1978. – 89. – c. 423–437.
398. Will G, Jauris-Heipke S, Schwab E, Busch U, Rossler D, Soutschek E, Wilske B, Preac-Mursic V. Sequence analysis of ospA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species // Med Microbiol Immunol (Berl). – 1995. - 184(2). – c. 73-80.
399. Wilske B., Jauris-Heipke S., Lobentanzer R., Pradel I., Preac-Mursic V., Rössler D., Soutschek E., Johnson R.C. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype // J. Clin. Microbiol. – 1995. – 33. – c. 103-109.
400. Wilske B., Preac-Mursic V., Göbel U.B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis // J Clin Microbiol. - 1993. - 31(2). – c. 340-50

401. Wilske, B., Busch U., H. Eiffert, V. Fingerle, H. W. Pfister, D. Rossler, and V. Preac-Mursic. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from patients with neuroborreliosis in Germany // *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)*. - 1996.- 184. – c. 195-201.
402. Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Göbel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis // *J. Clin. Microbiol.* - 1993.- 31. - c. 340-350.
403. Wonham M.J., de-Camino-Beck T., Lewis M.A. An epidemiological model for West Nile virus: invasion analysis and control applications // *Proc Biol Sci.* – 2004. – 271(1538). – c. 501-7.
404. Xu, Y., and R. C. Johnson. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains // *J. Clin. Microbiol.* - 1995.- 33. – c. 2679-2685.
405. Xu, Y., C. Kodner, L. Coleman, and R. C. Johnson. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* type strain B31 // *Infect. Immun.* - 1996.- 64. - c. 3870-3876.
406. Yanagihara, Y., and T. Masuzawa. Lyme disease (Lyme borreliosis) // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 1997.- 18. – c. 249-261.
407. Yang S, He M, Liu X, Li X, Fan B, Zhao S. Japanese encephalitis virus infects porcine kidney epithelial PK15 cells via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis // *Virol J.* - 2013. - 10. - c. 258.
408. Yang, X.F., U. Pal, S.M. Alani, E. Fikrig, and M.V. Norgard. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete // *J. Exp. Med.* – 2004. – 199. – c .641–648.
409. Yoshii K, Mottate K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M, Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I. Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan // *J Vet Med Sci.* – 2011. - 73(3). – c. 409-12.

410. Yrjnen Y, Oksi J, Kalimo H. Viljanen MK. Invasiveness of different genospecies of *B. burgdorferi* sensu lato in brain tissue // In: Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. - ASM, Washington, DC. – 351 c.
411. Zhang Z.F., Wan K.L., Zhang J.S. Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China // Chin. J. Epidemiol. – 1997. – 18. – c. 8-11.