

На правах рукописи

Ковалев Сергей Юрьевич

**ПРОИСХОЖДЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

03.02.02 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Екатеринбург - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина».

Официальные оппоненты:

Игнатъев Георгий Михайлович, д.м.н., профессор, ФГУП «Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и Предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, заместитель директора по экспериментально-аналитической работе.

Лукашев Александр Николаевич, д.м.н., профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова», зав. лабораторией молекулярной биологии.

Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., профессор, ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, зав. лабораторией эпидемиологии природно-очаговых инфекций.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Защита состоится «26» января 2017 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а), <http://www.instmech.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

И.В. Яковлева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Широкое распространение, высокий риск инфицирования и тяжесть заболевания делают клещевой энцефалит (КЭ) одной из самых актуальных природно-очаговых вирусных инфекций в России. На территории России ежегодно регистрируется до 10 тыс. случаев КЭ. В европейской части страны заболевание протекает, как правило, в виде тяжелой лихорадки, тогда как в азиатской части часто встречаются менингеальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы КЭ. Известны также случаи хронических форм (Gritsun et al., 2003). Летальность при КЭ колеблется в различных географических районах достаточно широко - от 0,03 до 20-35% (Локтев, 2007). Этиологическим агентом КЭ является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Основными переносчиками ВКЭ являются иксодовые клещи *I. ricinus* L. и *I. persulcatus* Schulze.

Для адекватного прогнозирования развития эпидемической ситуации и оценки тенденций в развитии региональных особенностей клинических проявлений заболевания в современных условиях становится крайне актуальным перманентный мониторинг генетической структуры природных популяций ВКЭ. Очевидно, что для этого необходима надежная и информативная система дифференциации штаммов в пределах субтипа ВКЭ, позволяющая изучать вопросы, связанные с происхождением и поддержанием природных очагов КЭ, динамикой изменения генетической структуры популяций ВКЭ, антропогенным и другими воздействиями на биоценоз, а также позволяющая предсказать появление новых эпидемически важных вариантов ВКЭ.

Вопросы эволюции ВКЭ до настоящего времени остаются открытыми. Так, на основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генома или его фрагментов (ген E) были выдвинуты три взаимоисключающие - как по направлению распространения по территории Евразии, так и по времени происхождения - гипотезы эволюции ВКЭ (Zanotto et al., 1995, Субботина и Локтев, 2012, Heinze et al., 2012). Очевидно, что разрешение возникшего противоречия возможно путем создания единой гипотезы эволюции ВКЭ, которая опиралась бы не только на данные филогенетики, но и учитывала интегральные знания об особенностях экологии и биологии вируса, ко-эволюции вируса и

членистоногого хозяина.

Накопленный к настоящему времени значительный материал по географическому распространению генетических вариантов ВКЭ, а также других клещевых флавивирусов требует рационального объяснения их появления на неэндемичных территориях. Учет возможных факторов, обеспечивающих их распространение, является приоритетной задачей молекулярной эпидемиологии ВКЭ. Однако, нельзя исключать и то, что в отдельных случаях обнаружение таких вирусов может быть обусловлено человеческим фактором, а именно кросс-контаминацией и (или) лабораторными ошибками при работе с вирусами или их генетическим материалом. Выявление и учет таких случаев необходим для получения реального представления о границах ареалов субтипов ВКЭ и их отдельных филогенетических линий.

Степень разработанности темы исследования

Современная классификация ВКЭ, основанная на филогенетическом анализе последовательностей генома, выделяет три субтипа: европейский (ВКЭ-Ев), переносчиком которого является клещ *I. ricinus*, сибирский (ВКЭ-Сиб) и дальневосточный (ВКЭ-Дв) с переносчиком *I. persulcatus* (Злобин и др., 2001). Также некоторые исследователи предполагают существование четвертого (штамм 178-79) и пятого (группа штаммов «886-84») субтипов, выделенных на территории Восточной Сибири в районе оз. Байкал (Демина и др., 2012). Показано, что каждый субтип обладает собственным ареалом, хотя штаммы всех трех субтипов встречаются с той или иной частотой и в других регионах (Адельшин и др., 2006, Злобин, 2010, Погодина и др., 2007, Kim et al., 2009, Ko et al., 2010). Большинство штаммов ВКЭ (75%), выделенных на территории России, относятся к сибирскому субтипу (Злобин, 2010), в составе которого выделяют две филогенетические линии: Балтийскую и Сибирскую (Golovljova et al., 2008).

Для объяснения вопросов эволюции и распространения генетических вариантов ВКЭ выдвинут ряд гипотез (Zanotto et al., 1995, Субботина и Локтев, 2012, Heinze et al., 2012), однако все они основаны на модели молекулярных часов и не учитывают их возможную неравномерность, а также роль коэволюционных процессов. Тем не менее, показано, что возникновение новых вирусов или их генетических вариантов часто связано с переходом вируса на новый вид хозяина («host-jump»). Общеизвестными примерами являются вирус гриппа (Schultz et al., 1991) или вирус тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV (Li

et al., 2006). Анализ имеющихся литературных данных дает основания предполагать, что «host-jump» может являться ключевым фактором в эволюции вирусов.

Цель исследования: разработать систему классификации вируса клещевого энцефалита в пределах субтипа и на основе комплексного подхода предложить гипотезу о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции ВКЭ.

Задачи исследования:

1. Разработать систему дифференциации ВКЭ в пределах субтипа;
2. Определить факторы, влияющие на распространение ВКЭ в локальном и глобальном масштабе;
3. Предложить методологические подходы эффективного мониторинга ВКЭ в природных очагах;
4. Установить филогеографическую структуру популяций таежного клеща *I. persulcatus* на основе анализа последовательностей фрагментов ядерной и митохондриальной рРНК;
5. Изучить популяции близкородственных видов иксодовых клещей в зонах симпатрии для выявления межвидовых гибридов;
6. Установить основные факторы, определяющие эволюцию ВКЭ, и предложить наиболее вероятный сценарий эволюционной истории ВКЭ;
7. Установить значение кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок в работе с клещевыми флавивирусами на примере референсного штамма *Sofjin*. Обосновать необходимость генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов.

Научная новизна

На примере ВКЭ сибирского субтипа впервые показано, что решающим фактором в распространении вируса на территории России является хозяйственная деятельность человека, связанная с процессами колонизации Урала и Сибири с начала XVII века.

Впервые показано, что антропогенный фактор может оказывать прямое влияние на формирование генетической структуры популяций ВКЭ как в прошлом, так и в настоящем, например, при реализации долгосрочной Всесоюзной программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц, действовавшей с 30-х по 1991 год прошлого века.

Впервые предложена система дифференциации ВКЭ в пределах

субтипа, основанная на выделении элементарной структурной единицы вирусной популяции – кластерона. Данный подход позволил эффективно классифицировать природные очаги как по количеству, так и по размеру кластеронов, и тем самым заложить основы для постоянного комплексного мониторинга эпидемиологической и эпизоотологической ситуации.

Применение кластеронного подхода для анализа популяций ВКЭ на территории Среднего Урала впервые позволило дать исчерпывающую генетическую характеристику популяций ВКЭ в данном регионе. Была показана филогеографическая связь между популяциями ВКЭ различных природных очагов, установлены механизмы их формирования.

Впервые расшифрован полный геном аутентичного референсного штамма *Soffin* (ВКЭ-Дв), выделенного в 1937 году первой Дальневосточной экспедицией под руководством проф. Л.А. Зильбера.

Впервые показана ошибочность представлений о высокой генетической изменчивости популяций *I. persulcatus* таежной зоны России на уровне генов рРНК, что указывает на непригодность данных генетических маркеров для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ.

Впервые показана возможность существования в зонах симпатрии гибридов близкородственных видов клещей рода *Ixodes* – основных хозяев ВКЭ и возбудителей других природно-очаговых инфекций.

Выдвинута новая гипотеза, позволяющая объяснить широкий круг вопросов, касающихся механизмов распространения и эволюции ВКЭ.

Практическая и теоретическая значимость работы

Настоящая работа является первым комплексным исследованием, позволяющим прояснить вопросы происхождения, распространения и эволюции ВКЭ. Филогеографический и временной анализ большого количества нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E штаммов ВКЭ, выделенных в ходе выполнения данной работы на территории Урала, Сибири, Северо-запада России, а также представленных в GenBank, показал, что в основе распространения и формирования природных очагов КЭ лежит антропогенный фактор, а не естественные причины, как было принято считать ранее.

Показана принципиальная возможность выделения отдельных групп штаммов ВКЭ («кластеронов») на основе идентичности аминокислотной

последовательности фрагмента гликопротеина Е вируса и типу территориального распределения штаммов.

Разработана и успешно применена система перманентного мониторинга популяций ВКЭ в природных очагах Среднего Урала на основе кластерного подхода.

Определены нуклеотидные последовательности фрагмента генома (фрагмент гена Е) 500 штаммов ВКЭ сибирского и дальневосточного субтипов (номера доступа в GenBank GU339055, GU444122-GU444286, NM008973- NM008985, JX315719- JX316000).

Определена полная нуклеотидная последовательность генома аутентичного референсного штамма ВКЭ *Soffin* дальневосточного субтипа, выделенного в 1937 году первой Дальневосточной экспедицией под руководством проф. Л.А. Зильбера (номер доступа в GenBank DQ486861).

Показано, что близкородственные виды иксодовых клещей в зонах их симпатрии образуют гибридные популяции, которые, как предполагается, могут играть важную роль в эволюции ВКЭ, выступая в качестве переходного звена при смене вирусом членистоногого хозяина.

Материалы исследований были использованы при подготовке программ курсов лекций «Молекулярная генетика» и «Биоинформатика» биологического факультета УрФУ им. Б.Н. Ельцина.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала в себя использование общенаучных методов познания и комплексного подхода к изучению проблем эволюции вируса клещевого энцефалита. Для выполнения исследования были использованы общепринятые методы сбора клещей и молекулярно-генетического анализа (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, секвенирование ДНК, филогенетический анализ). Для анализа полученных данных были применены оригинальные методы и подходы, разработанные непосредственно соискателем: 1) кластерный подход как метод дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа 2) мониторинг природных очагов клещевого энцефалита на основе анализа кластерной структуры вируса; 3) Выявление гибридов близкородственных видов иксодовых клещей методом ПЦР в реальном времени.

Положения, выносимые на защиту

1. Дифференциация штаммов ВКЭ на группы (кластероны) по идентичности аминокислотной последовательности фрагмента

гликопротеина E и типу их территориального распределения позволяет предложить классификацию ВКЭ в пределах субтипа.

2. Антропогенный фактор (хозяйственная деятельность человека) является решающим в распространении ВКЭ и формировании очагов КЭ как в прошлом, так и в настоящем.

3. В пределах субтипа ВКЭ кластероны могут быть представлены в виде кластеронной структуры, пространственно-временной анализ которой позволяет проводить эффективный мониторинг очагов КЭ.

4. Субтипы ВКЭ произошли в ходе квантовой эволюции путем преодоления вирусом межвидового барьера близкородственных видов иксодовых клещей (основных хозяев). В основе квантовой эволюции ВКЭ лежат три феномена: высокая скорость нуклеотидных замен при репликации вирусного генома, комплементация и гибридизация близкородственных видов клещей в зоне симпатрии.

5. Близкородственные виды клещей комплекса *I. ricinus* в зоне симпатрии способны к гибридизации и формированию популяций, состоящих из гибридов первого поколения, а также гибридов с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК.

6. Филогеографическая структура клеща *I. persulcatus* является самой гомогенной из всех иксодовых клещей комплекса *I. ricinus*; гены рРНК непригодны для выявления генетически различных популяций данного вида и изучения процессов формирования его коэволюционных связей с ВКЭ.

7. Штаммы ВКЭ, депонированные в вирусных коллекциях, а также используемые при производстве вакцин, нуждаются в обязательной генетической паспортизации с целью устранения возможной контаминации и (или) лабораторной ошибки.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов.

Материалы диссертации были представлены на научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.П. Чумакова (Москва, 2009), на региональных научно-практических конференциях (Екатеринбург, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011), на всероссийских научно-практических конференциях с международным участием (Москва, 2004,

2007, 2011, 2013; С.-Петербург, 2005, 2012, 2013, 2014; Новосибирск, 2005; Екатеринбург, 2006, 2009; Омск, 2007, 2011, 2014; Н.-Тагил, 2008, 2012; Волгоград, 2010), на международных конференциях по проблемам инфекционных заболеваний (С.-Петербург, 2008), по развитию научных исследований и надзору за инфекционными заболеваниями (С.-Петербург, 2010), по новым подходам к вакцинации против клещевого энцефалита (ISW-TBE Вена-Австрия, 2011), по проблемам природно-очаговых болезней, посвященной 75-летию открытия вируса клещевого энцефалита (Иркутск-Листвянка, 2012).

По теме диссертации опубликовано 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 – в российских и 9 – в зарубежных изданиях, цитируемых в базах Web of Science и Scopus, глава в коллективной монографии и 20 статей в сборниках научных конференций.

Место выполнения работы и личный вклад автора

Все лабораторные исследования были проведены на базе лаборатории молекулярной генетики Института естественных наук ФГАОУ ВПО «Уральского федерального университета им. первого Президента РФ Б.Н. Ельцина». Образцы клещей и (или) их пулов были получены в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», а также собраны лично автором и сотрудниками лаборатории молекулярной генетики УрФУ. Штаммы ВКЭ получены в ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций (ЕНИИВИ) Роспотребнадзора». Основные результаты получены лично автором, которым была генерирована идея исследования, сформулированы цели, задачи и выводы. Самостоятельно проведено большинство лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 323 страницах машинописного текста, из них 68 - приложения, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, который включает 305 наименований, в том числе 76 отечественных и 229 зарубежных авторов. Работа содержит 15 таблиц, иллюстрирована 39-ю рисунками и 10-ю приложениями.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В исследовании были использованы иксодовые клещи, полученные от людей, обратившихся по поводу укуса клеща в вирусологическую лабораторию ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» (ЦГиЭСО). Также были исследованы пулы клещей (от 1 до 20 особей), собранные в природе в районах Свердловской области. Кроме того, были исследованы одиночные клещи, собранные сотрудниками Лаборатории молекулярной генетики УрФУ в результате экспедиционной работы, а также волонтерами из различных регионов и областей России (Архангельская область, Пермский край, Свердловская, Курганская, Тюменская, Омская, Новосибирская и Томская области, Приморский край, Ханты-Мансийский Автономный округ, Ленинградская область, Алтайский край, Эстония). Все сборы проводились в эпидсезоны с 2005 по 2013 гг. В общей сложности было исследовано более 20 тыс. клещей. В те же годы проводились исследования клинического материала: образцы сыворотки и плазмы крови больных КЭ, а также образцы тканей погибших от КЭ людей (более 200 образцов).

В данной работе были определены нуклеотидные последовательности 500 изолятов ВКЭ, которые представлены двумя группами. Первая группа представлена 54 штаммами ВКЭ, выделенными в период с 1966 по 1986 годы из клещей (или пулов) и клинических образцов, собранных на территории Свердловской области сотрудниками лаборатории арбовирусных инфекций Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций. Кроме того, в исследование были включены два штамма *SofjinVT1999* и *SofjinVM2001* из инактивированных вакцин. Вторая группа представлена 446 изолятами вируса, выделенными с 2005 по 2013 годы из клещей (или их пулов) и клинического материала на эндемичных по КЭ территориях Северо-западной части России, Урала, Западной Сибири и Приморского края. Изоляты ВКЭ второй группы представлены геномной РНК, конвертированной в кДНК. В исследование также были взяты 604 нуклеотидные последовательности ВКЭ, размещённые в базе данных GenBank. Во избежание терминологической путаницы «изолят» и «штамм» в дальнейшем будут именоваться как «штамм».

Методы исследования

Экстракция РНК. Вирусная РНК была экстрагирована из 100 мкл суспензии клещей, сыворотки крови больных или разведенной в ТЕ-буфере лиофилизированной мозговой суспензии инфицированных мышей-сосунков, очищена с помощью наборов для выделения РНК (РНК-сорб, РНК-преп, МАГНО-сорб (ООО «Интерлабсервис»)) и конвертирована в кДНК с помощью набора «РЕВЕРТА-R-100» (ООО «Интерлабсервис»).

Аmplификация и секвенирование. В ходе работы была проведена амплификация и секвенирование фрагмента гена E ВКЭ (506 н.п.) согласно (Ternovoi et al., 2003), а также фрагментов генов 28S рРНК клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* (340 н.п.) согласно (McLain et al., 2001), 12S рРНК *I. persulcatus* (351 н.п.) согласно (Beati and Keirans, 2001).

Для секвенирования кодирующей области генома штамма *SoffinKSY* было получено 13 перекрывающихся ПЦР-продуктов с праймерами, разработанными в настоящем исследовании. Амплификация 5'- и 3'-нетранслируемых областей была проведена с помощью набора "Mint RACE cDNA amplification set" (Евроген). Также были определены последовательности гена E вакцинных штаммов. Сборка полной геномной последовательности была проведена с помощью SeqScape software v. 2.5 (Applied Biosystems, США). Полногеномная последовательность штамма *SoffinKSY* и последовательности гена E двух вакцинных штаммов были размещены в GenBank под номерами JF819648, JF819650 и JF819651.

Для определения видовой принадлежности клещей, собранных в Томской области (*I. persulcatus* или *I. pavlovskyi*), а также на территории Эстонии (*I. ricinus* или *I. persulcatus*), образцы ДНК клещей были исследованы методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием видоспецифичных зондов (мишень – митохондриальный ген *cox1*).

Для выявления межвидовых гибридов клещей те же образцы ДНК были исследованы с помощью аналогичной ПЦР-РВ с видоспецифичными зондами на ядерный внутренний транскрибируемый спейсер между 5.8S и 28S рРНК (ITS2). Для определения соотношения аллелей разных видов у гибридных особей в природных популяциях были использованы значения порогового цикла ΔC_t , полученные для экспериментальных смесей. Кроме

того, было проведено клонирование полной последовательности ITS2 гибридных особей и ПЦР-скрининг полученных трансформантов. Клоны ITS2 гибридов с разными соотношениями аллелей *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi* и *I. ricinus*/*I. persulcatus* были отобраны для последующего секвенирования.

Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов проводили прямым секвенированием на генетическом анализаторе ABI PRIZM® 310 (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов BigDye Terminator v.3.1, согласно инструкции производителя.

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ был проведен на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E длиной 454 н.п. (номера позиций с 311 по 762 н.п.) и аминокислотных последовательностей длиной 151 а.о. фрагмента белка E (с 104 по 254 а.о.) изученных нами изолятов, а также 604 последовательностей фрагмента гена E, размещенных в GenBank. Филогенетический анализ проводили с помощью Mega v.5.0 (Tamura et al., 2011), построение филогенетической сети – с помощью Phylogenetic Network Software v. 4.6.1.0 (fluxus-engineering.com).

Скорость накопления синонимических нуклеотидных замен была рассчитана с использованием метода Li W.H. с соавторами (Li et al., 1988).

Информация о территориальном распределении кластеронов ВКЭ-Сиб доступна в виде файла карты Google Earth Clusters_TBEV-Сиб_update1.kml (<http://dnk-ural.ru/nauchnaya-rabota/kleshchevoj-entsefalit>).

Моделирование структуры РНК и белков. Вторичная структура D3 сегмента 28S рРНК была смоделирована для последовательности *I. persulcatus*, полученной в настоящей работе, а также последовательностей из GenBank (*I. persulcatus* AF303997, *Cordyceps scarabaeicola* AF339524, *Mus musculus* NR_003279). Предсказание вторичной структуры осуществлялось при помощи Mfold (<http://mobyule.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=mfold>). Гомологичное моделирование структуры белка E штамма Zausaev ВКЭ-Сиб (AA043537) было выполнено с использованием сервера ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отдельные аспекты изучения распространения ВКЭ и эволюции клещей *Ixodes persulcatus* на территории России

Молекулярно - эпидемиологическая характеристика популяций ВКЭ на территории Среднего Урала. В настоящей работе была предложена однораундовая мультиплексная ПЦР для генотипирования ВКЭ, которая была применена для типирования 167 ВКЭ-позитивных образцов кДНК. Определение субтипа удалось провести лишь для 84 образцов (50,3%), вероятно, по причине меньшей чувствительности генотипоспецифической ПЦР по сравнению с диагностической. Установлено, что доминирующим на территории Свердловской области является ВКЭ-Сиб (более 95%). Проведенное исследование вносит ясность в вопросе о структуре популяции ВКЭ в Свердловской области, важным признаком которой является полное доминирование в природных очагах ВКЭ-Сиб, а единичные находки ВКЭ-Ев и, возможно, ВКЭ-Дв не имеют сколько-нибудь существенного значения.

Позднее были проведены исследования генетического разнообразия ВКЭ на территории Среднего Урала методом секвенирования фрагмента гена E, которые полностью подтвердили полученные в настоящей работе результаты, за исключением факта редких находок изолятов ВКЭ-Ев. Анализ этих последовательностей показал ошибочность определения четырех изолятов ВКЭ-Сиб как ВКЭ-Ев за счет частичного отжига праймера, специфичного для ВКЭ-Ев. Таким образом, можно утверждать, что на территории Среднего Урала распространен исключительно ВКЭ-Сиб, в связи с чем возникла необходимость дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа.

Происхождение и распространение ВКЭ-Сиб на Среднем Урале, в европейской части России и в Прибалтийских странах. В то время как анализ нуклеотидных последовательностей 165 изолятов ВКЭ-Сиб, полученных в настоящей работе, и штаммов ВКЭ-Сиб из GenBank не выявил филогенетически значимые группы штаммов, анализ соответствующих аминокислотных последовательностей позволил сделать ряд выводов. Так, 80% изученных штаммов ВКЭ-Сиб (132) было представлено шестью кластерами с идентичной аминокислотной последовательностью фрагмента белка E, которым были даны названия А,

называемой «Балтийской» филогенетической линии ВКЭ-Сиб (Golovljova et al., 2008). Возраст этой группы штаммов составил 274 (232-338) года.

50,9% изолятов (84), выделенных на Среднем Урале, относились к кластеру А, в который также входили штаммы из Западной и Восточной Сибири (прототипный штамм *Zausaev*). Возраст этой группы штаммов, по нашим данным, составляет 396 (335-488) лет, однако представители этого кластера на Среднем Урале ограничены возрастом в 218 (184-268) лет. Таким образом, штаммы кластера А могли попасть на территорию Среднего Урала не ранее конца XVIII века. Пространственно-временной анализ результатов позволил сделать предположение о том, что заселение штаммами ВКЭ-Сиб территории Среднего Урала проходило дважды. Первое заселение началось в конце XVI - в начале XVII веков, а второе - в конце XVIII века. При этом источниками распространения, вероятно, были разные природные очаги ВКЭ-Сиб Западной Сибири.

Наша оценка возраста вирусной популяции ВКЭ-Сиб, циркулирующей на территории Среднего Урала, составила чуть менее 400 лет, что хорошо согласуется со временем такого исторического события, как начало освоения Сибири Московским государством. Именно в 1598 году была полностью построена и начала действовать первая сухопутная Дорога в Сибирь, которая связала Европейскую часть России с Западной Сибирью (рис. 2). Она просуществовала более 150 лет, являясь единственной дорогой в Сибирь через Уральские горы, и официально прекратила свое существование во второй половине XVIII века. Таким образом, мы связываем появление первых штаммов Балтийской филогенетической линии ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала с началом действия первой сухопутной Дороги в Сибирь.

К середине восемнадцатого века первая сухопутная Дорога в Сибирь полностью утратила свое экономическое и политическое значение, поскольку с 1763 года весь транспортный поток в Сибирь начал идти через Транссибирскую магистраль. Следствием функционирования этой дороги стала вторая волна распространения штаммов ВКЭ-Сиб (кластер А) на территории Среднего Урала.

Основным фактором распространения по дорогам клещей, а соответственно и ВКЭ, вероятно, являлся их перенос на большие расстояния лошадьми, домашним скотом, а также собаками, которые сопровождали обозы, идущие из Сибири. Кроме того, перенос клещей мог происходить за счет миграции вдоль дорог синантропных видов

млекопитающих и птиц. Поскольку продолжительность питания взрослой самки клеща *I. persulcatus* на млекопитающем составляет в среднем 8 ± 2 дня (Konnai et al., 2008), то преодолевая в день вместе с обозом в среднем 50 км пути, она могла быть перемещена на расстояние в 300 – 500 км.



Рис. 2. Распределение штаммов ВКЭ-Сиб по двум дорогам из Европейской части России в Сибирь.

Настоящим исследованием была продемонстрирована теснейшая связь молекулярно-генетических данных и исторических событий, которая раскрывает новые горизонты для эпидемиологии вирусных заболеваний.

Происхождение штаммов неэндемичных субтипов ВКЭ в ходе реализации Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц. Ретроспективным исследованием коллекции штаммов ВКЭ ЕНИИ вирусных инфекций, выделенных в период с 1966 по 1986 годы, было установлено, что на территории Среднего Урала циркулируют штаммы двух субтипов ВКЭ – сибирского и дальневосточного, причем доля штаммов ВКЭ-Дв составляла 18,6% (11 из 59), а в период с 2005 по

2009 годы – всего 1,3% (2 из 151), т.е. примерно за 40-летний период произошло более чем десятикратное снижение количества штаммов ВКЭ-Дв. Таким образом, можно предположить, что очаги, образованные штаммами ВКЭ-Дв на неэндемичных территориях, были нестабильны, и, следовательно, нуждались в постоянном притоке штаммов.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E изолятов ВКЭ-Дв, выделенных на территории Свердловской области, Европейской части России и бывших республик СССР (Латвия, Эстония, и Украина), а также Сибири, показывает, что эти штаммы генетически близки различным штаммам ВКЭ-Дв, выделенным на Дальнем Востоке России и в восточной части Северного Китая (рис. 3).

Кроме того, расположение мест выделения штаммов ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала и Европейской части бывшего СССР носит мозаичный характер без очевидной связи между собой, что говорит в пользу их случайного появления (рис. 3). Время выделения большинства из них (почти 90%) приходится на годы существования Советского Союза (до распада СССР в 1991 году). Мозаичный характер распространения штаммов ВКЭ-Дв на неэндемичных территориях не укладывается в гипотезу клинальной эволюции ВКЭ и позволяет предположить их относительно недавнее появление, вероятно, в результате хозяйственной деятельности человека.

Рассмотрение истории экономической деятельности в бывшем СССР, а также пространственно-временной анализ мест выделения штаммов ВКЭ-Дв позволили предположить, что наиболее вероятным видом такой деятельности была долгосрочная государственная Программа по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц («Программа») (Павлов и др., 1973). Она действовала на протяжении более 60 лет с начала 30-х до середины 90-х годов, при этом общее количество переселенных животных составило более миллиона особей млекопитающих и более 400 тыс. особей птиц (Павлов и др., 1973, 1974, 1996, 1999). Поскольку переселяемые виды зверей и птиц в своем большинстве являлись естественными прокормителями иксодовых клещей, они могли либо переносить зараженных вирусом клещей, либо сами, будучи инфицированными, заражать клещей в местах выпуска штаммами ВКЭ из мест их отлова. Следует отметить, что реализация «Программы» проходила на территории бывшего СССР и не затрагивала другие государства.

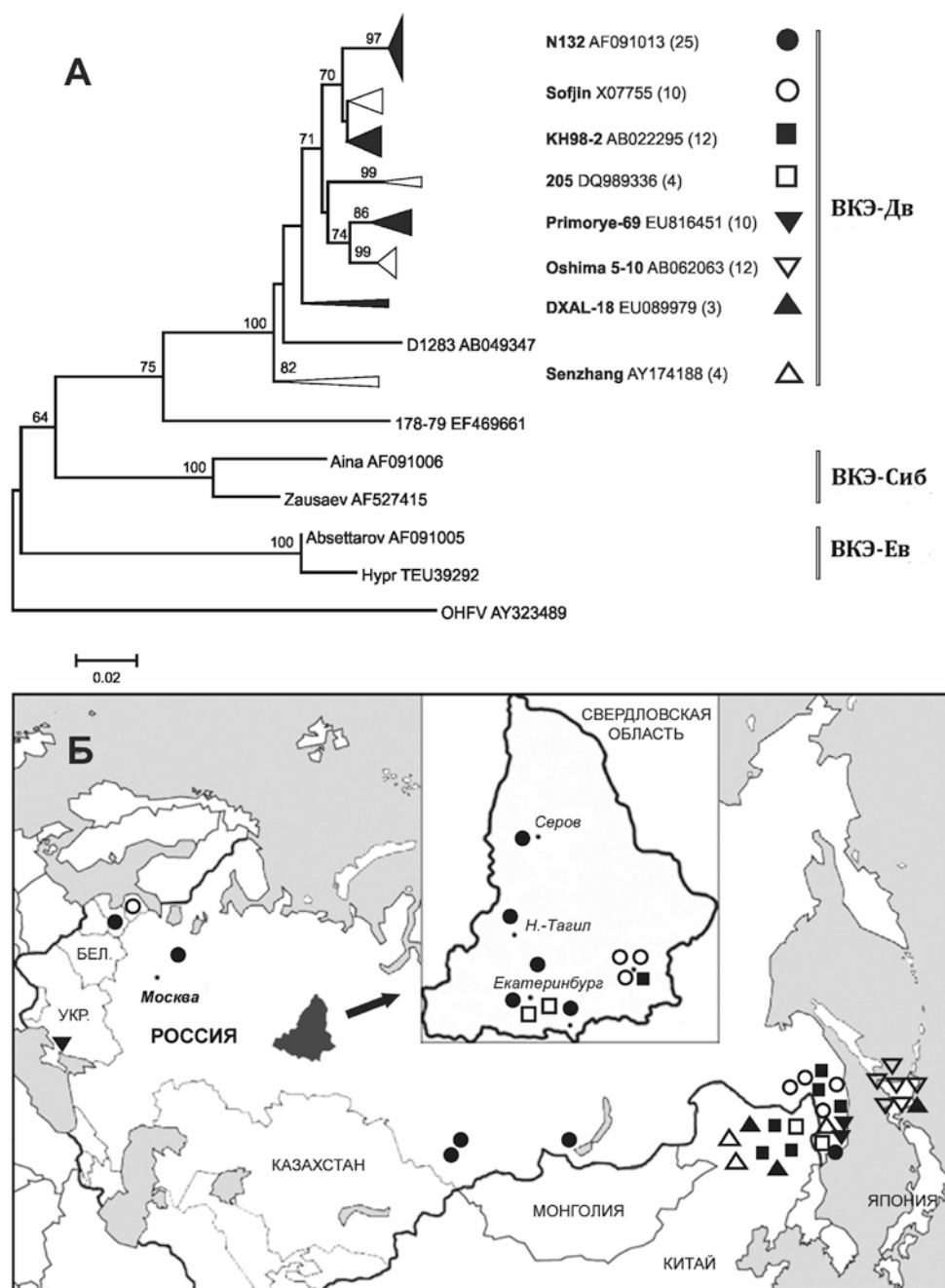


Рис. 3. Распространение штаммов ВКЭ-Дв на территории бывшего СССР. **А.** Дендрограмма, построенная на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E штаммов ВКЭ-Дв. Группы штаммов, названные соответственно прототипным штаммам, выделены значками. **Б.** География выделения штаммов ВКЭ-Дв на территории бывшего СССР, выноска – территория Свердловской области. Значки соответствуют группам.

В «Программу» были вовлечены все области России и Союзные республики бывшего СССР. Расселение зверей и птиц носило преимущественно направленный характер – с Востока на Запад, из малонаселенных территорий Восточной Сибири и Дальнего Востока в

Западную Сибирь, Урал и особенно в Европейскую часть бывшего Советского Союза, включая Эстонию, Латвию, Литву, Белоруссию, Украину.

Предлагаемая гипотеза распространения неэндемичных штаммов ВКЭ за счет переселения человеком диких млекопитающих и птиц, а также домашних животных, носит универсальный характер и позволяет объяснить появление штаммов ВКЭ-Дв в Сибири, на Среднем Урале и Европейской части бывшего Советского Союза.

Проблема «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Среднем Урале за последние 60 лет. В 2007 году в журнале *Вопросы вирусологии* вышла статья *Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя* (Погодина и др., 2007). В данной публикации авторы, основываясь на сравнении хронологических рядов штаммов ВКЭ, описали феномен изменения генотипического состава штаммов ВКЭ, выделенных за почти 70-летний период на территории Свердловской области. На основании этого делается вывод о том, что в Свердловской области «за 60 лет произошли кардинальные изменения в структуре популяций ВКЭ: дальневосточный подтип, который доминировал в 40-е годы XX века, был замещен сибирским подтипом, занявшим его экологическую нишу». Гипотеза «смены» генотипов ВКЭ нашла отражение в ряде публикаций (Герасимов и др., 2011; Карань и др., 2007; Колясникова, 2008; Погодина и Колясникова, 2008).

В настоящей работе приводится ряд аргументов, показывающих несостоятельность представления о смене генотипа ВКЭ на Среднем Урале.

1. В настоящей работе было показано, что изоляты, выделенные на территории Среднего Урала, представляют практически все генетическое разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб, а возраст вирусной популяции составляет приблизительно 400 лет, что указывает на её формирование на протяжении нескольких столетий, а не в последние 60 лет, как следует из выводов авторов обсуждаемой гипотезы.

2. Причины смены субтипов ВКЭ связываются с изменением экосистем вследствие антропогенной трансформации естественных ландшафтов, что привело к формированию производных лесов с новыми растительными группировками. Однако, необходимо учесть, что наряду с

вышесказанным происходили и обратные процессы. Так, на значительной территории Свердловской области антропогенно-трансформированные ландшафты возвращались к своему естественному состоянию как раз в то время, когда, по мнению авторов, происходила смена субтипов ВКЭ. Кроме того, отдельные территории области практически не подвергались промышленной эксплуатации в рассматриваемый период по причине своей экономической бесперспективности. Следовательно, на таких территориях должны были сохраниться многочисленные эндемичные очаги с циркуляцией штаммов ВКЭ-Дв, которые, однако, не были обнаружены.

3. В качестве ключевого доказательства смены генотипов ВКЭ приводятся результаты исследования фрагмента генома 23 штаммов, выделенных М.П. Чумаковым с сотрудниками в 1939-1945 гг. на территории Свердловской области: «Ретроспективное генотипирование этих штаммов показало абсолютное доминирование ВКЭ-Дв (22 (95,7%) из 23 штаммов)». Однако, значительная доля штаммов была получена из клинического материала, что не позволяет делать достоверные выводы о распределении субтипов ВКЭ вследствие неслучайности выборки.

4. Как было показано выше, наиболее вероятной причиной распространения неэндемичных штаммов ВКЭ стала реализация государственной «Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц». Таким образом, обнаружение ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала могло быть результатом хозяйственной деятельности человека, а не показателем его изначального доминирования в структуре популяций ВКЭ на данной территории.

Подводя итог, можно с уверенностью утверждать, что проблемы смены генотипов не существует, есть только проблема нашего понимания причин, по которым штаммы ВКЭ-Дв заносились в прошлом на неэндемичные территории.

Референсный штамм *Sofjin* вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности. ВКЭ был открыт в 1937 году на Дальнем Востоке России (Зильбер, 1939). Первой научной экспедицией, возглавляемой проф. Л.А. Зильбером, было выделено 30 штаммов ВКЭ, однако к настоящему времени сохранилось только два из них: *Sofjin*

(*Софьин*) и *Обор-4* (Погодина и др., 2007). Традиционно первые из выделенных штаммов патогенных вирусов *de facto* становились референсными для проведения сравнительных исследований, а часто и основой для производства вакцин. Первым в списке таких штаммов для ВКЭ стал штамм *Soffin*, выделенный недалеко от оз. Ханка (Приморский край) (Chumakov and Levkovich, 1985). Учитывая большое значение штамма *Soffin*, неудивительно, что он стал первым штаммом ВКЭ, чей геном был секвенирован (Pletnev et al., 1990; Плетнев и др., 1989). Однако, в настоящее время в базе данных GenBank находятся последовательности разных штаммов *Soffin*: *Soffin-HO* (AB062064), *Soffin-Ru* (JN229223), *SoffinKGG* (GU121963). Сравнительный анализ этих последовательностей обнаруживает существенные различия, которые могут превышать таковые, наблюдаемые между отдельными штаммами ВКЭ в пределах субтипа. В настоящей работе мы попытались разобраться в возникшей проблеме и установить подлинность штамма *Soffin*.

Для этого было проведено полногеномное секвенирование штамма *Soffin* из коллекции ЕНИИ вирусных инфекций (*SoffinKSY*). Кроме того, были получены последовательности гена Е двух вакцинных штаммов (*Soffin VT1999* и *SoffinVM2001*). Сравнение нуклеотидных последовательностей кодирующей области генома штамма *SoffinKSY* со штаммами *Soffin-HO* и *Soffin-P* показало идентичность 97,2%, т.е. нуклеотидная последовательность штамма *SoffinKSY* являлась уникальной и неродственной другим штаммам *Soffin* (рис. 4). Анализ последовательностей гена Е штамма *SoffinKSY* и двух вакцинных штаммов с последовательностями ВКЭ-Дв, представленными в GenBank, обнаружил три филогенетически обособленные группы. Штаммы *SoffinKGG*, *SoffinKSY*, *SoffinVT1999* и *SoffinVM2001* образовали первую группу штаммов *Soffin*, при этом штамм *SoffinKGG* является коллекционным штаммом, хранящимся в Институте полиомиелита и клещевых энцефалитов им. М.П. Чумакова. Вторая группа была представлена одним штаммом *Soffin-HO*. Третья группа состояла из штамма *Soffin-P*, его производного штамма химерного *TBE/Dengue* вируса (FJ828987) и *Soffin-Ru*.

Также нами был проведен анализ фрагмента консервативного гена NS5 штаммов *Soffin-P*, *Soffin-HO*, *Soffin-Ru*, *SoffinKSY* и штамма, обозначенного *SoffinCDC* (AF013399). Последовательность NS5 штамма

SoffinCDC, хранящегося в коллекции арбовирусов Центра по контролю и предупреждению заболеваний (США), показала филогенетическую близость (99,9% идентичности) к последовательности штамма *SoffinKSY*.

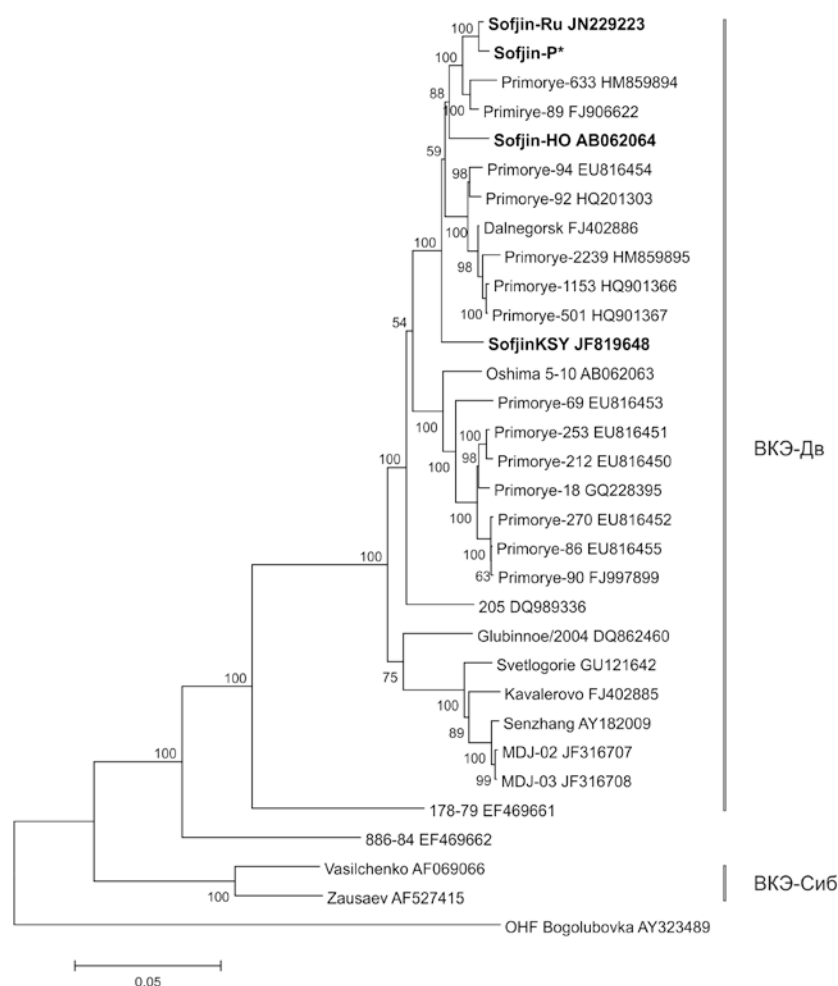


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе полипротеин-кодирующей последовательности (10,245 нт) штамма *SoffinKSY* и других известных штаммов ВКЭ-Дв.

В качестве наиболее вероятной причины столь выраженной генетической дивергенции трех групп штаммов *Soffin* является их ошибочное отнесение к штамму *Soffin* вследствие либо кросс-контаминации, либо лабораторной ошибки. Такие случаи в лабораторной практике встречаются довольно часто. В частности, в литературе описаны подобные случаи в отношении вирусов комплекса клещевого энцефалита (Venugopal et al., 1992; Ruzek et al., 2006; Mehla et al., 2009; Mandl et al., 1991).

Анализ лабораторной истории рассматриваемых штаммов показал аутентичность первой группы штаммов, в которую входят *SoffinCDC*, *SoffinKGG* и *SoffinKSY*. Таким образом, нуклеотидная последовательность

полного генома штамма *Soffin*, выделенного первой Дальневосточной экспедицией в 1937 году, только сейчас стала известна.

Проведенное исследование по установлению подлинности штамма *Soffin* поднимает важную проблему необходимости обязательного подтверждения соответствия лабораторных штаммов аутентичным коллекционным образцам молекулярно-генетическими методами.

Исследование генетической структуры клещей I. persulcatus как возможного фактора, определяющего генетическую изменчивость вируса. Клещи *Ixodes persulcatus* являются основными хозяевами и переносчиками ВКЭ-Сиб и ВКЭ-Дв. К настоящему времени накоплен значительный фактический материал относительно морфологии, особенностей биологии и экологии *I. persulcatus*, однако относительно структуры популяций клещей *I. persulcatus* имеется крайне мало данных. В связи с этим особого внимания заслуживает работа McLain D.K. с соавторами, показывающая наличие исключительной гетерогенности и географической структуры популяций данного вида по нуклеотидной последовательности варибельного сегмента D3 28S рРНК (McLain et al., 2001). Так как переносимые *I. persulcatus* патогены также отличаются неоднородной генетической структурой (например, ВКЭ имеет сибирский и дальневосточный субтип), мы можем получить прекрасную основу для изучения коэволюции возбудителей и их переносчиков.

В настоящей работе были получены последовательности фрагментов генов 28S (340 н.п.) и 12S рРНК (351 н.п.) 25 и 76 клещей из разных регионов России. Вопреки данным McLain D.K., была показана полная идентичность последовательностей варибельного сегмента D3 28S рРНК особей *I. persulcatus* на всем изученном ареале и лишь незначительная варибельность фрагмента гена 12S рРНК (1,14%). Столь сильные расхождения результатов McLain D.K. с нашими данными, вероятно, можно объяснить универсальностью используемых им праймеров в совокупности с недостаточным анализом полученных данных. Так, было установлено, что две последовательности сегмента D3 *I. persulcatus*, полученные McLain D.K. (AF303992, AF303993), обладают почти полной гомологией с последовательностями таких энтомопатогенных грибов, как *Beauveria* spp. и *Cordyceps* spp. Наличие грибов в клещах легко объясняется

особенностями их экологии и необходимостью постоянного контакта с почвой и растительностью. Так, ДНК грибов неоднократно выделялась из суспензий клещей (Tuininga et al., 2009). Кроме того, в образцах двух видов *Ixodes* (*I. kingi* и *I. sculptus*) были обнаружены грибы, ДНК которых амплифицировалась с праймерами, разработанными McLain D.K. (Anstead et al., 2011). Таким образом, выводы McLain об обособленности и значительной межпопуляционной изменчивости клещей *I. persulcatus* основываются на анализе чужеродных последовательностей. Было показано, что консервативные маркеры (гены рРНК) непригодны для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ, для чего должны быть использованы более вариабельные участки генома.

Популяционная структура и эволюция ВКЭ

Кластеронная структура популяций ВКЭ. В настоящем исследовании была показана принципиальная возможность дифференциации популяций ВКЭ-Сиб на отдельные группы штаммов (кластеры) по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента белка E. В продолжение этой работы был разработан т.н. кластеронный подход как основа для дифференциации популяций ВКЭ и создания классификации штаммов в пределах субтипа.

Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента гена E полученных в данной работе изолятов, а также последовательностей штаммов ВКЭ-Сиб из GenBank (всего 617 штаммов) позволило выделить 18 групп штаммов с одинаковой аминокислотной последовательностью. Для этих групп, ранее обозначенных как «кластеры», ввиду многозначности данного термина было предложено новое обозначение – «кластероны». Название кластерона состоит из цифрового и буквенного обозначения: цифра обозначает субтип (1 – ВКЭ-Дв, 2 – ВКЭ-Ев и 3 – ВКЭ-Сиб), а буква соответствует определенной аминокислотной последовательности. Количество штаммов, входящих в кластероны, варьировало от 3 (0,5%) до 285 (46,2%) (табл. 1). Было показано, что кластерон-специфичные аминокислотные замены расположены только на одной латеральной поверхности гликопротеина E, что свидетельствует об

их определенной функциональной роли. Одиночные штаммы, а также группы штаммов с количеством не более двух были отнесены группе *уникальных*, в которую вошли 117 (19,0%) штаммов. Из 151 аминокислот фрагмента белка E переменными были 70, однако кластероны были сформированы только 13 аминокислотными заменами (табл. 1).

Таким образом, популяции ВКЭ-Сиб могут быть представлены в виде кластеронов, которые отличаются количественным и качественным составом, т.е. могут быть охарактеризованы посредством кластеронной структуры.

Несмотря на то, что количество последовательностей фрагмента гена E штаммов ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, размещенных в GenBank, существенно меньше, чем ВКЭ-Сиб, кластеронная структура была показана также и для них. Позиции кластерон-специфичных аминокислотных замен для каждого субтипа, как правило, отличаются друг от друга (табл. 1). Особенности кластеронной структуры для трех субтипов ВКЭ приведены в табл. 2.

Таблица 1

Характеристика кластеронов ВКЭ-Сиб и кластерон-специфичные аминокислотные замены фрагмента гликопротеина E

Кластерон	Прототипный штамм	GenBank № доступ.	Кол-во штаммов, %	ds*	119	120	128	136	151	165	167	175	204	221	228	232	234
					A	A	T	K	V	F	V	T	K	N	K	A	H
3A	Zausaev	AF527415	285 (46.2)	135**	A	A	T	K	V	F	V	T	K	N	K	A	H
3B	Ekb125-2007	GU444253	35 (5.8)	6	N	.	.	.	G	Q
3C	Z6	EF566817	16 (2.6)	33	R
3D	Est54	DQ393773	50 (8.1)	68	N
3E	Ekb361-2008	GU444279	5 (0.8)	14	V	.
3F	Ekb91-2007	GU444225	39 (6.3)	48	R	.	.
3G	Kokkola-102	DQ451295	9 (1.5)	12	V	N
3H	Aina	AF091006	13 (2.1)	33	V	Q
3I	Ekb669-2006	GU444204	11 (1.9)	3	I
3J	IR99-1m1	AB049348	3 (0.5)	20	Q
3K	1130	EU443275	4 (0.6)	18	.	.	.	R
3L	1699	EU443268	4 (0.6)	34	.	.	I
3M	24	GU143822	3 (0.5)	16	I
3N	IR99-lm4	AB049349	3 (0.5)	19	S	.	.	.
3O	Ekb90-1-2007	GU444224	3 (0.5)	1	N	R
3P	Vologda-4-06	FJ214139	8 (1.3)	15	N	Y
3Q	Ekb752-2005	JX315727	5 (0.8)	3	S	.	N	.	.	.	G	Q
3U	886-84	EF469662	4 (0.6)	6	.	S	N
ЗУникальные			117 (19.0)														
Всего			617 (100)														

* – количество синонимических замен в фрагменте гена E;

** - только штаммы Азиатской филогенетической линии.

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей все кластероны ВКЭ-Сиб можно объединить в четыре монофилетические группы.

Таблица 2

Сравнение характеристик кластеронов субтипов ВКЭ

Субтип ВКЭ	Кол-во кластеронов	Минимальное кол-во изолятов в кластере	Число переменных позиций в кластерах	Кол-во всех переменных позиций, (%)	Кол-во изолятов	Кол-во изолятов в кластерах, (%)	Кол-во уникальных изолятов (%)
ВКЭ-Сиб	18	3	13	70 (46.4)	617	500 (81.0)	117 (19.0)
ВКЭ-Ев	10	2	9	28 (18.5)	191	166 (86.9)	25 (13.1)
ВКЭ-Дв	11	2	10	31 (20.5)	101	77 (76.2)	24 (23.8)
Всего	39	-	-	-	909	743 (81.7)	166 (18.3)

Кластероны ВКЭ-Сиб, относящиеся к первой филогенетической группе и составляющие большую часть изученных штаммов (3А, 3С, 3Е, 3F, 3I, 3К, 3L, 3М и 3N), распространены в основном в азиатской части ареала (Урал и Западная Сибирь), поэтому эта группа кластеронов была названа *Азиатской* (прототипный штамм *Zausaev*, AF527415). Вторая группа кластеронов (3Н и 3J) встречается на юге Западной Сибири и была названа *Южно-сибирской* (штамм *Aina*, AF091006). Третья группа (3В, 3D, 3G, 3O, 3P и 3Q), распространенная на Урале, Северо-западной части России, а также странах Балтии была названа *Восточно-европейской* или *Балтийской* (*Est54*, DQ393773). Четвертая группа (кластерон U, штамм 886-84) встречается в Бурятии и Северной Монголии и названа *Бурято-монгольской* (886-84, EF469662) (рис. 5).

Таким образом, *кластерон* – это структурный элемент популяции ВКЭ, состоящий из штаммов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность фрагмента гена E, как правило, связанных филогенетически и имеющих определенный тип территориального распределения. Количественный и качественный состав кластеронов, их размер, время и степень дивергенции определяют кластеронную структуру ВКЭ.

Связи между аминокислотными последовательностями кластеронов разных субтипов ВКЭ могут быть визуализированы с помощью филогенетической сети (рис. 5). Кластеронная структура ВКЭ-Сиб

является наиболее сложно организованной и может быть представлена в виде двух простых структур, различающихся по маркерной аминокислоте в позиции 175 белка E (рис. 5А) и соответствующих Балтийской и Сибирской филогенетическим линиям (Golovljova et al., 2008).

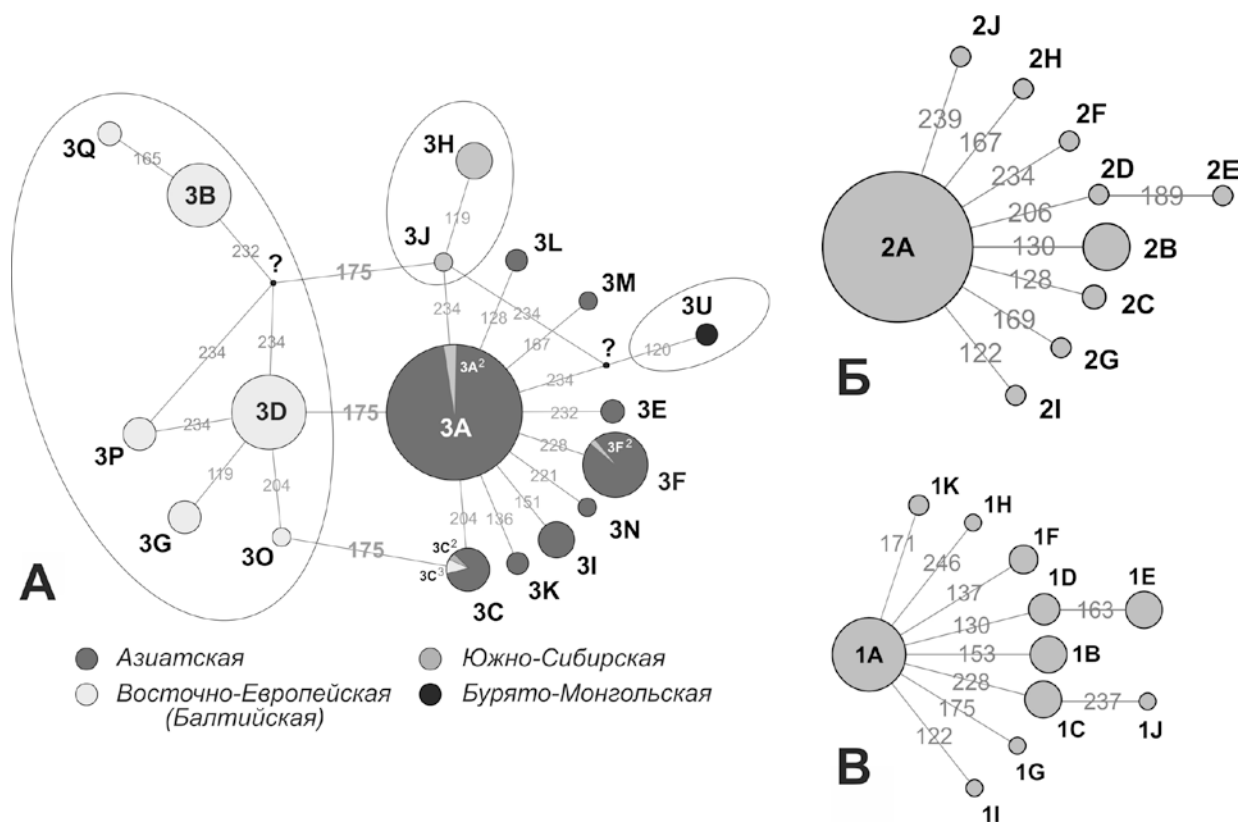


Рис. 5. Филогенетические сети, показывающие связи между последовательностями кластеронов: А. ВКЭ-Сиб, Б. ВКЭ-Ев, В. ВКЭ-Дв. Цифра в названии кластерона обозначает субтип ВКЭ (например, 1А, 2А и 3А относятся к ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно). Цветом и овалами выделены филогенетические группы кластеронов. Площадь кругов пропорциональна количеству штаммов в кластероне. Знаком вопроса обозначены последовательности, соответствующие которым кластероны пока не обнаружены. На линиях, связывающих кластероны, обозначены позиции аминокислотных замен в белке E.

Одним из основных понятий кластеронной структуры является кластерон-«основатель». В рамках кластеронного подхода предполагается, что «основателем» субтипа является самый многочисленный и географически распространенный кластерон. Так, кластероны 1А, 2А и 3А являются основателями ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно (рис. 5).

В настоящей работе было показано, что кластерон-специфичные аминокислотные замены расположены на латеральной поверхности

гликопротеина E, что свидетельствует о возможности вовлечения этих аминокислот в связывание с рецепторами поверхности клеток клеща (Ecker et al., 1999). Таким образом, географическая неоднородность в распределении кластеронов может быть результатом адаптации вируса к определенному виду (Gritsun et al., 2003), подвиду или даже локальной популяции клещей в ходе коэволюции.

Основываясь на распространенной теории квазивидов в отношении вирусов (Domingo et al., 1978), кластеронную структуру популяций ВКЭ можно рассматривать в виде спектра мутантов или квазивидов с разной степенью адаптации к клещу (основному хозяину). Небольшие кластероны, а также уникальные штаммы являются особой формой равновесия между естественным отбором и мутационным процессом, при котором эти варианты генома ВКЭ (“облака”) упорядочены (сгруппированы) около “мастер”-последовательности с максимальной приспособленностью крупных кластеронов, таких как 1А, 2А и 3А.

Кластероны как инструмент мониторинга популяций ВКЭ. Знание о генетической структуре популяций ВКЭ является ключом к пониманию закономерностей происхождения и эволюции вируса, а также процессов формирования и поддержания природных очагов КЭ. Для проведения мониторинга и принятия профилактических мер необходимо иметь максимально полное представление о территориальных особенностях возбудителя, в т. ч. о генетическом разнообразии штаммов ВКЭ. В настоящем исследовании в качестве инструмента мониторинга генетической структуры популяций вируса в природных очагах КЭ на региональном и локальном уровне был использован разработанный нами кластеронный подход.

Для проведения подобного исследования по целому ряду причин был выбран Средний Урал, представленный в основном Свердловской областью. За все время наблюдения, начиная с 1966 года, на территории Свердловской области было выделено 387 изолятов и штаммов ВКЭ-Сиб. Из них 321 (82,9%) были дифференцированы на кластероны, а остальные – отнесены к группе уникальных. На Среднем Урале выявлено 14 из 18 известных к настоящему времени кластеронов ВКЭ-Сиб. Уральские штаммы ВКЭ-Сиб представлены в основном Азиатской (более 80%) и в меньшей степени Восточно-европейской (около 20%) группами.

Было показано, что в Свердловской области количество кластеронов изменяется в широтном направлении. Так, наибольшее разнообразие (9 кластеронов) приходится на город Екатеринбург и его пригороды, а также южную часть Свердловской области между городами Екатеринбург и Тюмень, поскольку на юге области пролегает Транссибирская магистраль, связывающая Западную Сибирь с Европейской частью России. По мере продвижения на север кластеронное разнообразие штаммов ВКЭ существенно снижается (рис. 6), что связано с относительно недавним временем появления ВКЭ на севере области. Значительное кластеронное разнообразие на юге хорошо согласуется с ранее предложенной гипотезой о решающей роли антропогенного фактора в распространении ВКЭ-Сиб из Западной Сибири по дорогам, соединяющим эту территорию с Европейской частью России.



Рис. 6. Кластеронное разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала. Градации серого цвета отражают количество кластеронов.

Большинство кластеронов не являются уникальными для территории Среднего Урала. Однако, три кластерона – 3I, 3O и 3Q – встречаются только на данной территории, поэтому их эволюционная история представляет особый интерес. Филогенетический анализ показал клональное происхождение и низкое генетическое разнообразие штаммов

этих кластеронов (рис. 7). Кластерон 3Q (5 штаммов) имеет коридорный тип распределения с юга на север (примерно 300 км) и встречается только вдоль трассы Екатеринбург-Серов (рис. 7А). Кластерон 3Q, по всей видимости, является производным кластерона 3В (рис. 7Б), от которого он отличается одной аминокислотной заменой. Возраст кластерона 3Q составляет около 28 (24-37) лет. Кластерон 3O (3 штамма) имеет локальный тип распределения (город Камышлов) и происходит от группообразующего кластерона 3D (рис. 7Б). Возраст этого кластерона составляет всего 14 (12-17) лет. Локальный тип распределения характерен также и для кластерона 3I (пригород Екатеринбурга). Возраст кластерона 3I составляет 42 (36-52) года.

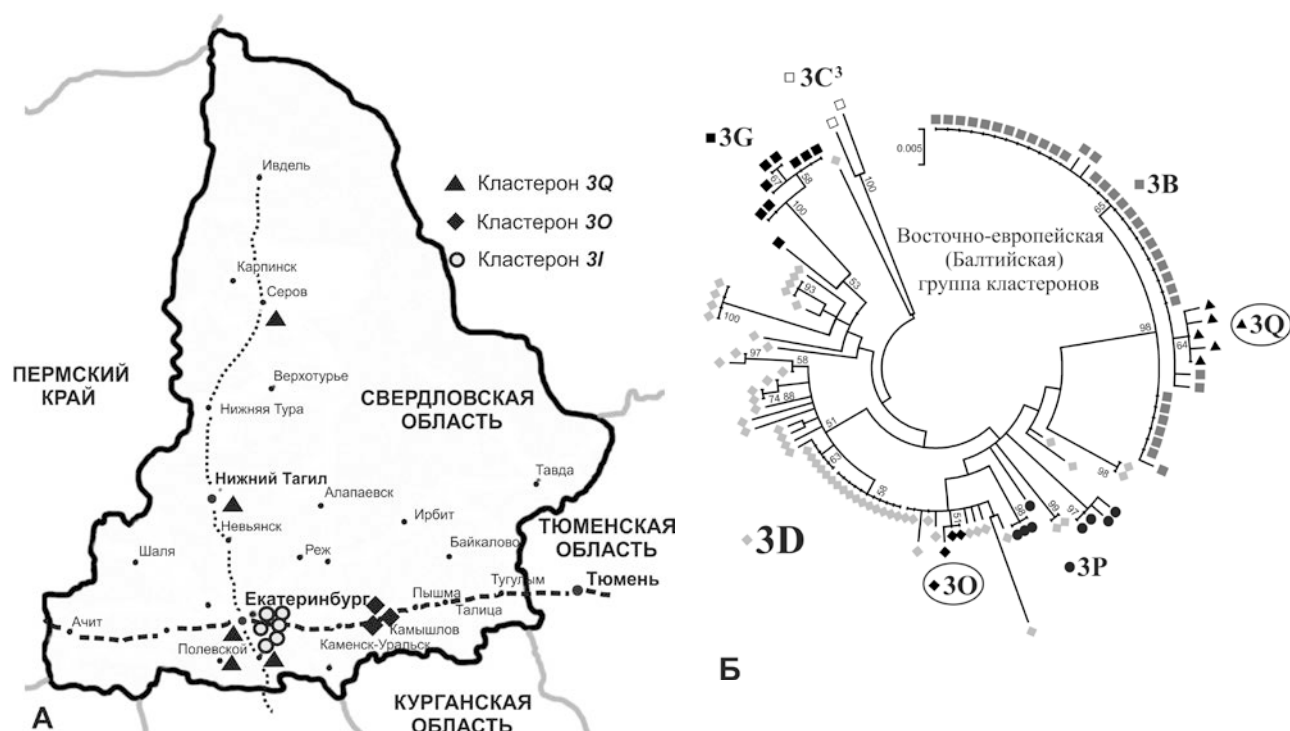


Рис. 7. А. Распределение кластеронов 3I, 3O и 3Q на территории Свердловской области. Б. Клональное происхождение кластеронов 3O и 3Q Восточно-европейской (Балтийской) филогенетической линии.

Присутствие «молодых» кластеронов в природных очагах свидетельствует об активном эволюционном процессе, происходящем в популяциях ВКЭ в настоящее время. Хотя для них естественно предположить локальный тип распределения, что подтверждается на примере кластеронов 3O и 3I, однако для кластерона 3Q был отмечен

коридорный тип (Рис. 7А). Штаммы этого кластерона были обнаружены вдоль трассы Екатеринбург-Серов протяженностью около 340 км, а также в окрестностях г. Екатеринбурга. На преодоление этого расстояния, исходя из возраста кластерона, должно было уйти около 30 лет. Причины высокой скорости распространения штаммов этого кластерона, а также близость к транспортным путям позволяет предположить, что в основе распространения кластерона *3Q* лежит хозяйственная деятельность человека. После тщательного сопоставления времени проводимых на интересующем нас участке долгосрочных масштабных мероприятий, мы пришли к выводу, что распространение штаммов данного кластерона произошло в результате строительства автомобильной трассы Екатеринбург-Серов. Строительство велось 11 лет (с 1975 по 1985 гг.) в одном направлении (от Екатеринбурга), преодолевая средним 30 км в год. Домашние животные, синантропные виды зверей и птиц, сопровождавшие бригады дорожных строителей на протяжении всего времени строительства, вероятнее всего, были основной причиной распространения зараженных вирусом клещей на большие расстояния за относительно короткое время.

В целом, штаммы ВКЭ-Сиб одного кластерона имеют клональное происхождение, однако, из этого правила могут быть исключения: незначительное количество штаммов кластеронов *3A*, *3C* и *3F* Азиатской группы принадлежит Балтийской и Южно-сибирской филогенетическим линиям ВКЭ-Сиб (обозначены как $3A^2$, $3C^2$, $3F^2$, $3L^2$ и $3C^3$). Конвергентное появление филогенетически разобщенных штаммов в этих кластеронах можно объяснить высокой вероятностью замены аминокислоты *Lys* на *Arg* (позиция 204 для кластерона *3C* и 228 – для *3F*), которая не приводит к изменению физико-химических свойств белка Е.

Каждый очаг КЭ имеет свой уникальный кластеронный профиль, определение которого и составление на его основе молекулярно - эпидемиологического паспорта очага КЭ может стать основой для мониторинга происходящих в нем микро- и макроэволюционных процессов. При этом любое изменение кластеронного профиля (появление нового или исчезновение уже известного кластерона, изменение размеров кластеронов) может свидетельствовать о существовании определенных процессов, влияющих на генетическую структуру вирусной популяции.

Для перманентного мониторинга генетической структуры вирусной популяции мы предлагаем следующие принципы:

(1) Основой для анализа является кластерон – клональная группа штаммов, обладающих идентичной аминокислотной последовательностью фрагмента белка E; (2) Показателями являются количественный состав, качественный состав, географическое распределение, время появления кластеронов; (3) Необходима максимально возможная выборка образцов со всех эндемичных территорий; (4) Мониторинг должен проводиться ежегодно на протяжении определенного периода времени; (5) В случае изменения показателей должны быть проведены дополнительные исследования для выяснения вызвавших их причин.

Квантовая эволюция вируса клещевого энцефалита. В настоящее время существует три взаимоисключающих гипотезы о месте возникновения и путях распространения ВКЭ (Heinze et al., 2012; Zanotto et al., 1995; Субботина и Локтев, 2012). Следует отметить, что все эти гипотезы основываются на концепции филетического градуализма, согласно которой эволюционные изменения носят равномерный и постепенный характер. Однако, высокая скорость накопления мутаций в геноме РНК-содержащих вирусов, их генетическая и фенотипическая неоднородность позволяют рассматривать эти процессы не с позиций классического градуализма, а с точки зрения квантовой эволюции (Simpson, 1944), смысл которой заключается в скачкообразном переходе организма из одной адаптивной зоны в другую с резким изменением генетических и фенотипических свойств без промежуточных стадий.

Пространственно-временной анализ кластеронной структуры популяций ВКЭ трех субтипов выявил ряд закономерностей. Во-первых, в ней обнаружена возрастная иерархия: кластероны - «основатели» всегда старше, чем производные от них кластероны (табл. 3).

Во-вторых, наблюдается возрастная иерархия и между кластеронами - «основателями» в структуре ВКЭ: $1A > (3A^2 > 3A > 3D) > 2A$, соответствующая правилу «чем западнее, тем моложе». Возраст самого «старого» кластерона - «основателя» $1A$ ВКЭ-Дв составляет более 650 лет, а самого «молодого» - $2A$ ВКЭ-Ев - около 300 лет, причем $3A^2$, $3A$, $3D$ ВКЭ-Сиб занимают промежуточное положение: 423, 367 и 310 лет соответственно (табл. 3).

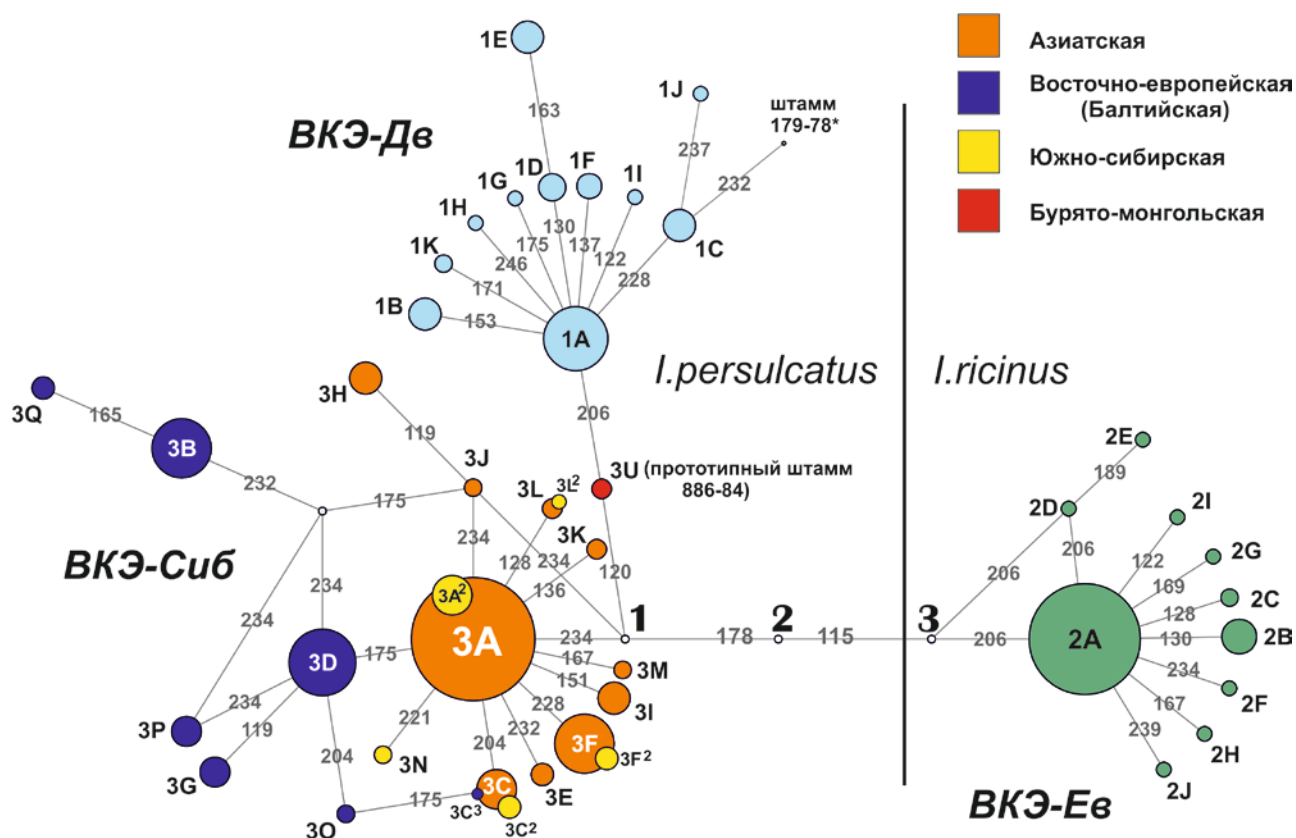


Рис. 8. Филогенетическая сеть кластеронов ВКЭ, построенная на основе последовательностей фрагмента белка Е всех трех субтипов. Цифрами 1, 2, 3 обозначены «точки перехода», цветом – субтипы ВКЭ и филогенетические линии внутри ВКЭ-Сиб.

В-третьих, было показано, что кластеронные структуры субтипов ВКЭ связаны между собой через кластероны - «основатели» переходами, состоящими из нескольких аминокислотных замен. Так, кластерон 1А ВКЭ-Дв связан с 3А ВКЭ-Сиб тремя переходами через кластерон 3U и *точку перехода 1*. В то же время 1А и 3А связаны с кластероном 2А ВКЭ-Ев пятью и четырьмя переходами соответственно, включая *точки перехода 1, 2 и 3*. За исключением кластерона 3U, представленного штаммами Бурято-Монгольской филогенетической линии (прототипный штамм 884-84), мы не обнаружили ни одного штамма, чья аминокислотная последовательность фрагмента белка Е соответствовала хотя бы одной из трех точек перехода. Важно отметить, что *точка перехода 1* связывает все кластеронные структуры ВКЭ (рис. 8).

Возраст основных кластеронов генотипов ВКЭ

Кластероны (кол-во штаммов) *	Количество синоним. замен	Максимальная генетическая дистанция (в количестве нуклеотидных замен)	Возраст (годы)
ВКЭ-Дв			
1A (64)	103	47	664 (560-815)
1B (9)	18	18	254 (214-312)
1C (4)	46	38	536 (452-659)
1D (3)	0	0	недавно
1E (5)	1	1	недавно
1F (3)	0	0	недавно
1H (8)	1	1	недавно
ВКЭ-Сиб			
<i>Азиатская группа</i>			
3A (300)	138	26	367 (309-451)
3C (13)	33	21	296 (250-364)
3F (40)	57	21	296 (250-364)
3J (4)	22	21	296 (250-364)
3H (13)	33	18	254 (214-312)
3K (8)	22	16	226 (190-277)
3N (3)	19	17	240 (202-294)
3V (3)	13	12	169 (143-208)
3E (5)	14	14	197 (166-242)
3M (4)	15	14	197 (166-242)
3I (11)	3	3	42 (36-52)
<i>Южно-сибирская группа</i>			
3A² (19)	51	30	423 (357-520)
<i>Восточно-европейская группа</i>			
3D (58)	71	22	310 (262-381)
3G (9)	12	12	169 (143-208)
3P (8)	15	11	155 (131-191)
3B (36)	6	3	42 (36-52)
3Q (5)	3	2	28 (23-34)
3O (4)	1	1	14 (12-17)
<i>Бурято-монгольская группа</i>			
3U (4)	6	6	85 (71-104)
ВКЭ-Ев			
2A (164)	103	23	325 (273-398)
2B (23)	24	14	197 (166-242)
2C (7)	17	14	197 (166-242)
2F (9)	15	13	184 (155-225)

* Кластероны численностью менее трех штаммов не показаны.

Кластеронная структура может быть интерпретирована в рамках теории квазивидов (Domingo, 2006): кластерон - «основатель» обладает максимальной адаптивностью и является «мастер» - последовательностью, а производные кластероны и уникальные изоляты представляют собой «облака» или спектр менее адаптированных мутантов

(рис. 8). При этом возраст субтипа ВКЭ, вероятно, соответствует возрасту его кластерона - «основателя», а именно возрасту самого «старого» кластерона - «основателя» 1А ВКЭ-Дв, насчитывающему более 650 лет (табл. 3). Следовательно, первые очаги КЭ появились на Дальнем Востоке, что соответствует ранее выдвинутой гипотезе о клинальном распространении ВКЭ с востока на запад Евразии (Zanotto et al., 1995).

ВКЭ-Ев, вероятно, появился из ВКЭ-Сиб в результате адаптивного скачка при смене вирусом основного членистоногого хозяина в зоне симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* (Северо-Запад России). Поскольку размножение вируса в «чужом» («новом») хозяине малоэффективно (Růžek et al., 2008), наиболее вероятным представляется сценарий, основанный на феномене образования гибридов между близкими видами клещей рода *Ixodes*. Поскольку гибриды обладают генотипами обоих видов, то они несут как «персулькатусные», так и «рицинусные» фенотипические признаки, одновременное присутствие которых у одной особи, по всей вероятности, обеспечивает необходимые условия для запуска механизма квантовой эволюции, приводящего к возникновению нового субтипа ВКЭ (ВКЭ-Ев) (рис. 9). При этом «персулькатусный» фенотип обеспечивает эффективное размножение ВКЭ-Сиб, в то время как другой – «рицинусный» – такой способностью не обладает. Известно, что размножение РНК-вирусов сопровождается появлением большого спектра дефектных (мутантных) вирусов за счет неспособности РНК-зависимой РНК-полимеразы корректировать неправильно включенные нуклеотиды при репликации вирусного генома (Holmes, 2009). Однако, дефектные вирусы могут поддерживаться в вирусной популяции благодаря хорошо известному феномену комплементации - негенетического взаимодействия двух вирусов, репродуцирующихся в одной и той же клетке (Aaskov et al., 2006; Moreno et al., 1997). В этих условиях в результате направленного отбора будет накапливаться пул вирусов, адаптированных к «рицинусному» фенотипу и способных к самостоятельному размножению (рис. 9) в клещах *I. ricinus*.

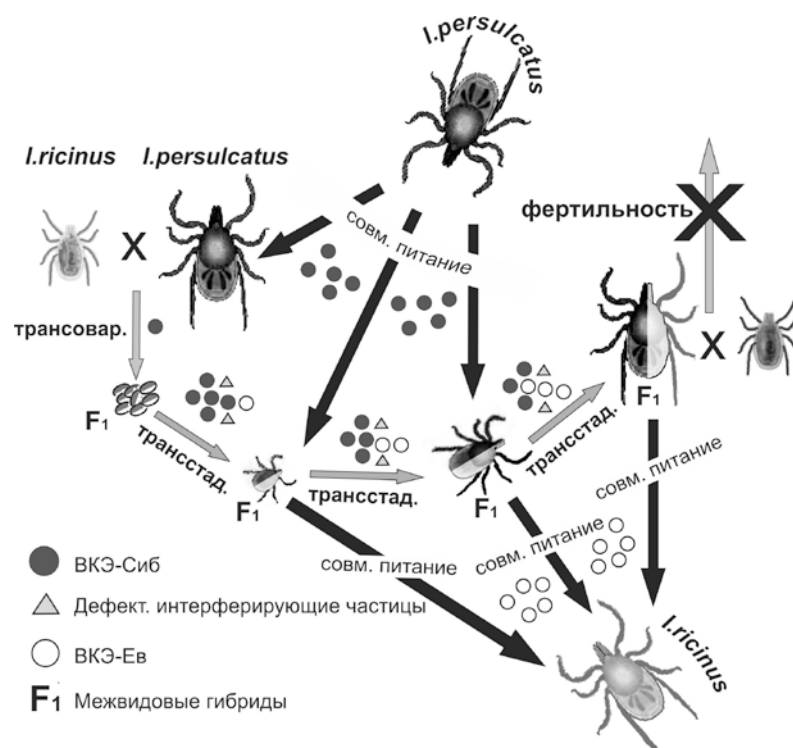


Рис. 9. Возможный механизм возникновения VKЭ-Ев из VKЭ-Сиб как элемент квантовой эволюции в зоне симпатрии ареалов клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на территории Европейской части России.

Подобный механизм можно предположить и для VKЭ-Сиб, произошедшего из кластерона – «основателя» 1А VKЭ-Дв в результате его перехода на новую популяцию или расу *I. persulcatus*, предположительно, в Забайкалье на территории Бурятии, Северной Монголии, Забайкальского края и Иркутской области. При этом промежуточной формой, вероятно, являлся кластерон 3U (прототипный штамм 886-84) (рис. 8), генетические особенности которого позволяют некоторым исследователям выделить его в отдельный субтип VKЭ (Demina et al., 2012; Demina et al., 2010).

Исходя из вышеизложенного, эволюция VKЭ, насчитывающая не более 700 (560-815) лет, может быть представлена как процесс последовательного возникновения одного субтипа из другого в результате квантовой эволюции (рис. 10), при этом движущей силой распространения вируса, по всей видимости, был антропогенный фактор. Так, штаммы самого «старого» субтипа VKЭ-Дв распространились в Забайкалье из первичных очагов Дальнего востока за счет функционирования торговых путей между Маньчжурским государством и

народностями, населявшими территорию Забайкалья и Западной Сибири в средние века (Chi, 1932). От этих штаммов в результате перехода на новую расу переносчика *I. persulcatus* около 400 лет назад произошел сибирский субтип, дальнейшее распространение которого по территории Урала, Северо-Запада России и стран Балтии связано со временем колонизации европейцами Сибири в начале XVII века. Попадание данного субтипа в зону симпатрии *I. persulcatus* и *I. ricinus* спровоцировало второй этап квантовой эволюции ВКЭ, в результате которого образовался европейский субтип (около 300 лет назад). После своего возникновения ВКЭ-Ев быстро распространился по ареалу клещей *I. ricinus*, чему способствовала высокая плотность населения и развитая сеть дорог.

Главная проблема гипотезы квантовой эволюции ВКЭ касается механизма появления новых генотипов вируса, значительные генетические различия которых (15% генома и более) возникли за короткий по эволюционным меркам промежуток времени (предположительно, несколько лет). Разрешение этой проблемы, по нашему мнению, лежит в свойствах пространственной организации вторичной и третичной структуры геномной РНК флавивирусов. Известно, что именно гликопротеин Е определяет уникальный механизм взаимодействия вируса с клеточным рецептором и, вероятно, в первую очередь подвергается отбору при адаптации вируса к новому хозяину. Можно предположить, что критические мутации в гене Е, возникающие в результате адаптации ВКЭ к новому для вируса клеточному рецептору, дестабилизируют пространственную организацию геномной РНК у части вирусных частиц, которые, однако, сохраняются в вирусной популяции благодаря феномену комплементации. Последующий отбор направлен на сохранение как мутаций, стабилизирующих пространственную структуру РНК, так и адаптивных мутаций в гене Е. Отбор идет до достижения дефектным вирусом способности к самостоятельному эффективному размножению, т. е. до появления нового вируса и может проходить очень быстро.

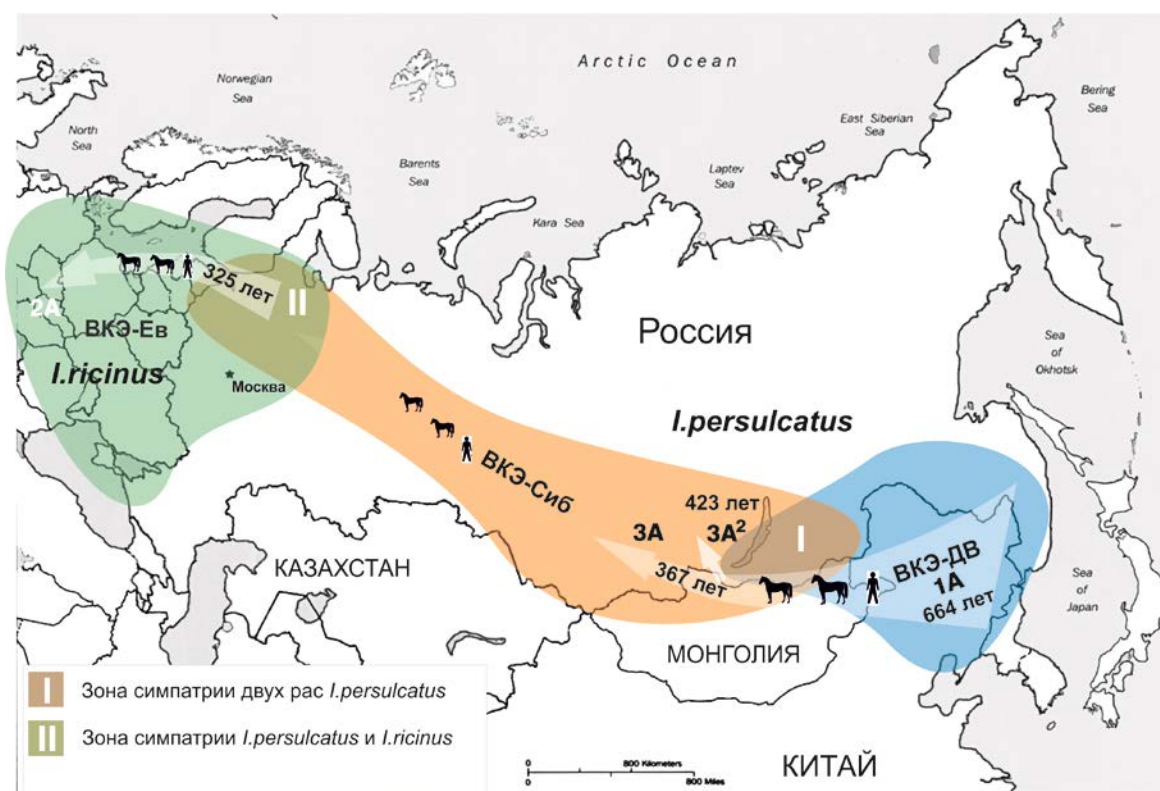


Рис. 10. Сценарий эволюции ВКЭ. Показаны предполагаемые пути распространения вируса, связанные с действием антропогенного фактора, а также рассчитанные возраста субтипа. Цветом выделены ареал *I. ricinus*, предполагаемые ареалы двух рас *I. persulcatus*, а также зоны их перекрывания (симпатрии).

Ключевым моментом предлагаемой гипотезы эволюции ВКЭ является предположение о том, что «молекулярные часы» при возникновении нового субтипа в результате смены вида хозяина идут со значительным ускорением, т.е. новый вирус возникает за короткий промежуток времени (скачкообразно). Важное преимущество данной гипотезы состоит в возможности ее экспериментальной проверки. Действительно, если гипотеза верна, то в гибридах клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* или в смешанных культурах их клеток в присутствии штамма ВКЭ-Сиб возможно зарегистрировать возникновение либо нового вируса, либо переходных генетических вариантов.

Гибридизация клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi* в симпатрических популяциях Западной Сибири. Способность к гибридизации клещей рода *Ixodes* в природе практически не исследована, главным образом потому, что выявить гибридные особи на основании морфологических признаков крайне сложно (Barton, 2001; Rees et al.,

2003). В частности, поиск феномена гибридизации клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярно-генетическими методами во многом сдерживался представлением о многоступенчатом механизме репродуктивной изоляции данных видов (Филиппова, 2001).

В настоящей работе впервые приводятся молекулярно-генетические доказательства существования в природе гибридов первого поколения (F1), беккроссов с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК, а также возможности интрогрессии мтДНК между близкородственными видами клещей рода *Ixodes* (*I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*) в области их симпатрии.

Стратегия исследования популяций иксодовых клещей в зоне симпатрии *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* для выявления межвидовых гибридов и интрогрессии мтДНК приведена на схеме (рис. 11).

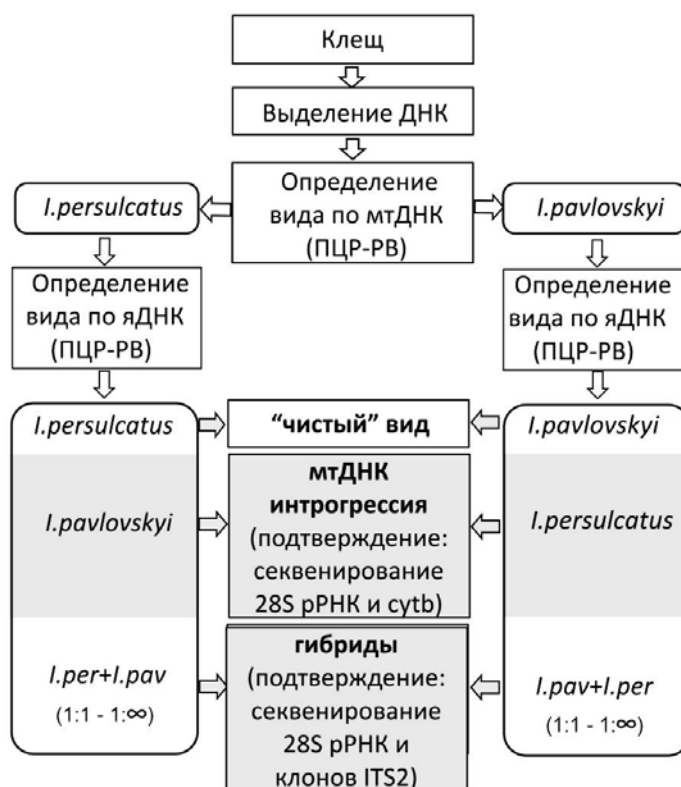


Рис. 11. Схема исследования популяций иксодовых клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* для выявления межвидовых гибридов и интрогрессии мтДНК в зоне симпатрии.

Всего было исследовано 783 взрослых особи клещей (383 самки и 400 самцов), собранных на флаг в Томской области (Западная Сибирь). Исследование мтДНК клещей (ген *cox1*) позволило определить 437 (55,8%)

особей как *I. persulcatus*, 346 (44,2%) особей – как *I. pavlovskyi*. Результаты определения видов по ядерному маркеру (ITS2) отличались: 447 (57,1%) особей было отнесено в виду *I. persulcatus*, а 257 (32,8%) – к *I. pavlovskyi*. При этом 79 (10,1%) образцов имели аллели обоих видов, т.е. являлись гибридами (табл. 4). Выборочное клонирование ПЦР-продуктов выявленных гибридов, включающих полную последовательность ITS2 длиной около 825 п. н., с последующим их секвенированием полностью подтвердило результаты ПЦР-РВ по определению видовой принадлежности аллелей.

Таблица 4

Результаты определения видовой принадлежности исследуемых клещей по митохондриальному и ядерному маркерам

мтДНК	ядНК			Всего
	<i>I. pavlovskyi</i>	<i>I. persulcatus</i>	Гибриды	
<i>I. pavlovskyi</i>	252 112♀, 140♂ (32,2%)	39 11♀, 28♂ (5,0%)	55 43♀, 12♂ (7,0%)	346 166♀, 180♂ (44,2%)
<i>I. persulcatus</i>	5 1♀, 4♂ (0,6%)	408 201♀, 207♂ (52,1%)	24 15♀, 9♂ (3,1%)	437 217♀, 220♂ (55,8%)
Всего	257 113♀, 144♂ (32,8%)	447 212♀, 235♂ (57,1%)	79 58♀, 21♂ (10,1%)	783 383♀, 400♂ (100%)

Анализ ПЦР-РВ кривых амплификации аллелей ITS2 позволил обнаружить как гибриды F1 (20 особей), так и беккроссы с разным уровнем интрогрессии данного участка генома клещей (59). Беккроссы, у которых доля ITS2-аллелей *I. pavlovskyi* была выше, чем доля аллелей *I. persulcatus* (44), встречались в 3 раза чаще, чем наоборот (15).

Сравнение видовой принадлежности клещей в исследуемой популяции по мтДНК (ген *cox1*) и яДНК (ITS2) (за исключением гибридов) показало наличие интрогрессии мтДНК. Так, среди 257 клещей, определенных как *I. pavlovskyi* по яДНК, 5 особей (1,95%) имели мтДНК *I. persulcatus*. Аналогично, среди 447 клещей, отнесенных к *I. persulcatus* по ядерной ДНК, 39 особей (8,7%) имели мтДНК *I. pavlovskyi* (табл. 4). Следует отметить, что у гибридов F1 мтДНК *I. pavlovskyi* встречалась в 4 раза чаще, чем мтДНК *I. persulcatus*.

Наши данные показывают, что многоступенчатый механизм репродуктивной изоляции, предположенный для *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, по всей видимости, не является строгим, о чем свидетельствует наличие гибридов F1 и беккроссов с разным уровнем интрогрессии яДНК другого вида. При этом интрогрессия ядерных генов и мтДНК между видами может осуществляться в обоих направлениях, однако, с разной эффективностью.

Гибридизация клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* в зоне их симпатрии: молекулярно-генетические доказательства. Для того, чтобы оценить распространенность и масштабность феномена межвидовой гибридизации клещей, необходимо было доказать её возможность не только между филогенетически близкими видами (как в случае *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*), но и более отдаленными, например, *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Было показано, что данные виды не имеют морфологических препятствий для спаривания, однако, дают стерильное потомство (Балашов и др., 1998).

В настоящей работе мы применили схему, предложенную для пары *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* (рис. 11), для обнаружения межвидовых гибридов *I. ricinus* и *I. persulcatus* в зоне их симпатрии на территории Эстонии (всего 265 нимф и имаго клещей обоих видов). Все изученные особи были разделены на три группы: 1) «чистые» виды: и мтДНК, и яДНК принадлежат одному виду; 2) гибриды по яДНК (аллели обоих видов); 3) гибриды и по яДНК, и по мтДНК. Среди особей, морфологически определенных как *I. ricinus*, только 72,1% оказались «чистыми» *I. ricinus*, в то время как для *I. persulcatus* процент правильности морфологического определения оказался значительно выше – 99,3%. Данный факт связан с тем, что 24,6% клещей, морфологически определенных как *I. ricinus*, оказались гибридными особями (всего 31 гибридная особь – 11,7% от общего числа исследованных клещей) (табл. 5). Для подтверждения феномена гибридизации было проведено выборочное клонирование ПЦР-продуктов трех образцов ДНК гибридов, которые, судя по соотношению аллелей, оказались беккроссами с разным уровнем интрогрессии яДНК.

Таблица 5

Результаты определения видовой принадлежности исследуемых клещей по митохондриальному и ядерному маркерам

мтДНК	ядДНК			Всего
	<i>I. ricinus</i>	<i>I. persulcatus</i>	Гибриды	
	89		23	112
<i>I. ricinus</i>	37N, 25♀, 27♂ (33,6%)	0	7N, 6♀, 10♂ (8,7%)	44N, 31♀, 37♂ (42,3%)
		145	3	148
<i>I. persulcatus</i>	0	19N, 72♀, 54♂ (54,7%)	2♀, 1♂ (1,1%)	19N, 74♀, 55♂ (55,8%)
			5	5
Смесь	0	0	4N, 1♂ (1,9%)	4N, 1♂ (1,9%)
	89	145	31	265
Всего	37N, 25♀, 27♂ (33,6%)	19N, 72♀, 54♂ (54,7%)	11N, 8♀, 12♂ (11,7%)	67N, 105♀, 93♂ (100%)

Обнаружение гибридов *I. ricinus* и *I. persulcatus* в природе свидетельствуют о несостоятельности представлений о полной репродуктивной изоляции между этими видами. Поскольку мтДНК *I. ricinus* у выявленных гибридов детектировалась в 8 раз чаще, чем *I. persulcatus*, был сделан вывод о выраженной асимметрии гибридизации. Хотя высокий процент гибридных особей в изученных популяциях предполагал существование особей с интрогрессией мтДНК (по аналогии с парой *I. persulcatus* – *I. pavlovskyi*), в нашем исследовании они не были обнаружены.

Существование гибридных популяций в зоне симпатрии клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* может иметь большой практический и теоретический интерес с точки зрения влияния гибридов на особенности распространения переносимых ими патогенов, а также на процессы ко-эволюции этих патогенов и их членистоногих хозяев. Так, в гипотезе квантового видообразования ВКЭ межвидовым гибридам этих клещей отводится роль посредника при смене вирусом членистоногого хозяина. Согласно этой гипотезе, ВКЭ-Ев возник непосредственно из ВКЭ-Сиб путем образования промежуточных вариантов ВКЭ с низкой приспособленностью в межвидовых гибридах.

Данные, полученные в настоящей работе, позволяют рассматривать явление гибридизации близкородственных видов иксодовых клещей как явление, широко распространенное в областях их симпатрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение в составе отдельных субтипов ВКЭ групп филогеографически связанных между собой штаммов – кластеронов – дает исследователям уникальную возможность по-новому взглянуть на процессы происхождения, распространения и эволюции ВКЭ. Так, любая популяция ВКЭ может быть представлена как совокупность кластеронов и быть выражена в виде кластеронной структуры, изменение которой является методологической основой для эффективного мониторинга и позволяет выявлять особенности и механизмы формирования и поддержания природных очагов КЭ.

Предлагаемая концепция происхождения, распространения и эволюции ВКЭ дает возможность детально реконструировать эволюционную историю ВКЭ как во времени, так и пространстве. Данные, полученные в результате такой реконструкции, однозначно указывают на экономическую деятельность человека как основной фактор распространения ВКЭ на территории Евразии. При этом формы и масштабы такой деятельности могут быть различными, будь то освоение Западной Сибири в отдаленном прошлом, акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в прошлом веке или строительство дорог в настоящее время. Учет антропогенного фактора может кардинально повлиять на систему мероприятий по профилактике и борьбе с КЭ.

Изучение вопросов эволюции, а также установление региональных особенностей распределения генетических вариантов ВКЭ и других флавивирусов невозможны без выявления и исключения случаев кросс-контаминации и (или) лабораторной ошибки при работе со штаммами вируса. Работа по установлению подлинности одного из трех штаммов *Sofjin* показала, что такие ошибки происходят достаточно часто и могут приводить к серьезным последствиям. Отсутствие критериев выявления таких ошибок и критического отношения к работе вирусологических лабораторий может ввести в заблуждение исследователей и привести к неправильной интерпретации полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что распространение ВКЭ по территории Сибири, Урала и Северо-Запада России проходило по транспортным путям: Первой сухопутной дороге в Сибирь и Транссибирской дороге во времена колонизации Сибири;

2. Выдвинуто предположение о том, что распространение штаммов ВКЭ на неэндемичных территориях может быть связано с реализацией долгосрочных государственных программ по Акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц;

3. Показана возможность объединения штаммов ВКЭ в группы (кластероны) по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента гликопротеина Е и типу территориального распределения;

4. На основе кластерного подхода предложена классификация ВКЭ в пределах субтипа; исследованы вопросы происхождения, распространения и эволюции вируса, а также разработаны теоретические принципы перманентного мониторинга вирусных популяций на разных территориальных уровнях;

5. Показана ошибочность представлений о высокой генетической изменчивости популяций *I. persulcatus* таежной зоны России на уровне генов рНК, что указывает на непригодность данных генетических маркеров для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ;

6. Дано обоснование необходимости обязательной генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов ВКЭ для выявления и учета кросс-контаминаций и (или) лабораторных ошибок;

7. Разработана концепция квантовой эволюции ВКЭ, в основе которой лежит представление о быстрой перестройке вирусного генома в результате смены вирусом основного хозяина (клеща);

8. Открыт феномен межвидовой гибридизации близкородственных видов иксодовых клещей в зонах их симпатрии, выдвинута гипотеза о широком распространении этого явления среди клещей комплекса *I. ricinus*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Ковалев С.Ю.** Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вируса клещевого энцефалита на территории Свердловской области на основе качественной и генотипоспецифической ОТ-ПЦР/ **С.Ю. Ковалев**, Т.В. Умпелева, Т.Э. Снитковская, А.С. Килячина, В.В. Романенко, В.С. Кокорев, Н.П. Глинских // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т.53. – №2. – С. 27-32.
2. **Kovalev S.Y.** 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 / **S.Y. Kovalev**, D.N. Chernykh, V.S. Kokorev, T.E. Snitkovskaya, V.V. Romanenko // Journal of General Virology. – 2009. – V.90. – №12. – P. 2884-2892.
3. **Kovalev S.Y.** Distribution of Far-Eastern TBEV subtype strains in the former Soviet Union / **S.Y. Kovalev**, V.S. Kokorev, I.V. Belyaeva // Journal of General Virology. – 2010. – V.91. – №12. – P. 2941-2946.
4. **Ковалев С.Ю.** Проблема «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Среднем Урале за последние 60 лет / **С.Ю. Ковалев**, Т.А. Мухачева, В.С. Кокорев // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т.57. – №4. – С. 45-48.
5. **Ковалев С.Ю.** Референсный штамм *Софьин* вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности / **С.Ю. Ковалев**, Т.А. Мухачева, В.С. Кокорев, И.В. Беляева // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – №4. – С. 48-51.
6. **Kovalev S.Y.** Phylogeographical structure of the tick *Ixodes persulcatus*: A novel view / **S.Y. Kovalev**, Т.А. Mukhacheva // Ticks Tick-borne Dis. – 2012. – V.3. – №4. – P. 212-218.
7. **Kovalev S.Y.** Tick-borne encephalitis virus: reference strain *Sofjin* and problem of its authenticity / **S.Y. Kovalev**, Т.А. Mukhacheva, V.S. Kokorev, I.V. Belyaeva // Virus genes. – 2012. – V.44. – №2. – P. 217-24.
8. **Kovalev S.Y.** Clusteron structure of tick-borne encephalitis virus populations / **Kovalev S.Y.**, Т.А. Mukhacheva // Infection, Genetics and Evolution. – 2013. – V.14. – №1. – P. 22-28.9.
9. **Kovalev S.Y.** Clusterons as a tool for monitoring populations of tick-borne encephalitis virus / **S.Y. Kovalev**, Т.А. Mukhacheva // Journal of Medical Virology. – 2014. – V. 86. – №2. – P. 283-289.

10. **Kovalev S.Y.** Tick-borne encephalitis virus subtypes emerged through rapid vector switches rather than gradual evolution / **S.Y. Kovalev**, T.A. Mukhacheva // Ecology and Evolution. – 2014. – V.4. – №22. – P. 4307-4316.

11. **Kovalev S.Y.** Natural hybridization of the ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in their sympatric populations in Western Siberia / **S.Y. Kovalev**, M.S. Mikhaylishcheva, T.A. Mukhacheva // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – V.32. – P. 388-395.

12. **Kovalev S.Y.** Natural hybridization between *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* ticks evidenced by molecular genetics methods / **S.Y. Kovalev**, I.V. Golovljova, T.A. Mukhacheva // Ticks Tick-borne Dis. 2015. – DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.005.

Монография

Ковалев С.Ю. Происхождение и распространение вируса клещевого энцефалита сибирского субтипа на Среднем Урале, в Европейской части России и Прибалтийских странах / **С.Ю. Ковалев**, Д.Н. Черных, В.С. Кокорев, Т.Э. Снитковская, В.В. Романенко // Глава в монографии Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. Новосибирск: СО РАН, 2011. С. 117-139.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ВКЭ-Дв – вирус клещевого энцефалита дальневосточного субтипа

ВКЭ-Ев – вирус клещевого энцефалита европейского субтипа

ВКЭ-Сиб – вирус клещевого энцефалита сибирского субтипа

ДИЧ – дефектная интерферирующая частица

кДНК – комплементарная ДНК

ККЭ – комплекс клещевого энцефалита

КЭ – клещевой энцефалит

МГ – межвидовые гибриды

мтДНК – митохондриальная ДНК

НТО – нетранслируемая область

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

рРНК – рибосомальная РНК

ядНК – ядерная ДНК

ITS2 – внутренний транскрибируемый спейсер 2 (internal transcribed spacer)

Ковалев Сергей Юрьевич

**ПРОИСХОЖДЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

03.02.02 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Подписана в печать Формат 60×90/16
Усл. печ. л. 2. Тираж 120 экз. Заказ №