

*На правах рукописи*

Сафонова Марина Викторовна

**ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА  
ВИРУСА КЕМЕРОВО (*P. ORBIVIRUS*, СЕМ. *REOVIRIDAE*)  
НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ**

03.02.02 – вирусология

14.02.02 – эпидемиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные руководители:**

**Дедков Владимир Георгиевич**, кандидат медицинских наук;  
**Симонова Елена Геннадиевна**, доктор медицинских наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Малецкая Ольга Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по научной и противоэпидемической работе, заведующая лабораторией эпидемиологии;

**Колясникова Надежда Михайловна**, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), заведующая лабораторией клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов.

**Ведущая организация** - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «   » \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_ 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, г. Москва, Малый Казенный переулок, д.5 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: <https://instmech.ru>

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2022 года

Учёный секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

И.В. Яковлева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

На территории Российской Федерации циркулирует большое число возбудителей природно-очаговых инфекций, значимое место среди которых традиционно принадлежит инфекциям, передающимся клещами (ИПК). Согласно данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», ежегодно более 50% зарегистрированных случаев заболевания населения природно-очаговыми инфекциями приходится именно на ИПК.

При этом учёту подвергается заболеваемость только по 7 наиболее актуальным инфекциям, в отношении которых на протяжении многих лет осуществляется эпидемиологический надзор: клещевой энцефалит (КЭ), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), клещевые риккетсиозы (сибирский клещевой тиф (СКТ), астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ) и др.), геморрагическая лихорадка Крым-Конго (ККГЛ) и лихорадка Ку (коксииеллёз).

Однако на территории Российской Федерации циркулирует не менее 50 арбовирусов, значительная часть которых переносится именно клещами (Львов, 1989), и подавляющее большинство из них являются малоизученными: регионы их циркуляции не охарактеризованы, эпидемический потенциал неизвестен.

Особый интерес в этом отношении представляют некоторые вирусы рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Орбивирусы способны инфицировать широкий круг позвоночных хозяев, но традиционно наибольшее внимание уделялось представителям рода, вызывающим экономически значимые заболевания сельскохозяйственных животных, в то же время, роль орбивирусов в патологии человека до сих пор окончательно не установлена.

Вирус Кемерово (КЕМV) – орбивирус, представитель группы Грейт-Айленд, распространённый на территории Российской Федерации, был впервые выделен в 1962 г. группой советских и чехословацких вирусологов под руководством академика М.П. Чумакова в эндемичном очаге клещевого энцефалита в Кемеровской области и активно изучался вплоть до 70-х годов прошлого столетия, после чего перешёл в разряд «забытых инфекций с неизвестным эпидемическим потенциалом». В настоящий момент учёт заболеваемости лихорадкой Кемерово не ведётся, специфическая диагностика не осуществляется, случаи заболевания не регистрируются.

Возрастание интереса к изучению вируса Кемерово со стороны вирусологов и эпидемиологов началось после 2010 года на волне всеобщего внимания учёных к

«забытым» инфекциям (Belhouchet *et al.*, 2010; Dilcher *et al.*, 2012; Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014).

Современные технологии молекулярного анализа открывают возможности для более глубокого изучения самого вируса Кемерово и его межвидовых взаимоотношений внутри группы вирусов Грейт-Айленд. Однако в настоящий момент использование этого подхода затруднено ввиду малого количества расшифрованных полногеномных последовательностей. Для вируса Кемерово в открытом доступе представлены полногеномные последовательности всего двух штаммов (HQ266591-HQ266660; KC288130-KC288139) и несколько фрагментов генома. Для более детального понимания внутривидовой генетической вариабельности вируса Кемерово, межвидовых взаимоотношений вирусов в группе Грейт-Айленд и оценки эпидемического потенциала необходимо расшифровать больше последовательностей геномов существующих штаммов.

### **Степень разработанности темы исследования**

Историю изучения вируса Кемерово можно условно разделить на два периода. Первый период продолжался с момента открытия вируса в 1962 г. до середины 70-х годов. В эти годы были описаны основные свойства вируса, доказана антигенная самостоятельность и способность вызывать энцефалит у человека (Chumakov *et al.*, 1963; Zemla, 1962; Casals, 1968b; Tihomirova, 1964; Borden *et al.*, 1971). В двух диссертационных работах, посвящённых вирусу Кемерово, даны особенности культивирования патогена, сравнительное изучение вирусов группы Кемерово (Семашко, 1971), изучены природные очаги вируса Кемерово и его роль в патологии человека (Михайлова, 1974).

Второй период в изучении вируса Кемерово начался в 2010 году и ознаменовался применением современных молекулярно-генетических методов. На данном этапе ему посвящена одна диссертационная работа, в которой освещены результаты исследования эпидемиологической значимости вируса Кемерово на территории Российской Федерации (Дедков, 2015).

На современном этапе отечественными и зарубежными учёными получены две первые полногеномные последовательности вируса Кемерово (Dilcher *et al.*, 2012), даны первые генетические характеристики вируса Кемерово и других близкородственных представителей группы Грейт-Айленд (Belhouchet *et al.*, 2010; Dilcher *et al.*, 2012; Dedkov *et al.*, 2014a). Различными исследовательскими коллективами продолжается изучение вирусоформности переносчиков в регионах циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации (Dedkov *et al.*, 2014b; Tkachev *et al.*, 2014; Tkachev *et al.*, 2017; Кривошеина *с соавт.*, 2017; Козлова *с соавт.*, 2018), при этом исследованию самого возбудителя не уделяется должного внимания.

В настоящий момент степень эпидемиологической опасности возбудителя никак не охарактеризована. Специфическая диагностика вызываемого вирусом заболевания не производится, вклад возбудителя в структуру заболеваемости населения ИПК остаётся невыясненным, при этом риски заражения населения, проживающего на эндемичных в отношении вируса Кемерово территориях, существенно недооценены.

### **Цель исследования**

Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово на основе данных о его генетическом разнообразии.

### **Задачи исследования**

1. Оценить распространённость вируса Кемерово на территории Российской Федерации на основании современных данных о заражённости иксодовых клещей.
2. Оптимизировать методику приготовления библиотек РНК-содержащих вирусов с двухцепочечным геномом для секвенирования высокопроизводительными методами.
3. Установить последовательность геномов штаммов вируса Кемерово, изолированных из различных источников на территории Российской Федерации.
4. Произвести сравнительный анализ и филогенетическую реконструкцию полученных полногеномных последовательностей.
5. Разработать балльную шкалу оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной этиологии и оценить эпидемический потенциал вируса Кемерово.

### **Научная новизна**

1. Получены полногеномные последовательности девяти штаммов вируса Кемерово, в том числе впервые – для штамма, изолированного от человека.
2. Впервые оценено внутривидовое генетическое разнообразие вируса Кемерово и механизмы его формирования.
3. Впервые на основании анализа полногеномных последовательностей рассмотрены видовые взаимоотношения представителей группы Грейт-Айленд на геномном уровне.
4. Обобщена и дополнена информация о циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации.
5. Разработана система оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, позволяющая оценить степень эпидемиологической опасности возбудителя в количественном выражении с оценкой ведущего фактора эпидемиологического риска.

### **Практическая значимость и внедрения**

Разработана количественная система оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций, которая может применяться как для уже известных возбудителей, так и для оценки рисков заражения населения, возбудителями новых и возвращающихся инфекций.

Депонированы в международную базу GenBank NCBI 9 полногеномных последовательностей штаммов вируса Кемерово и одна частичная, в том числе полногеномный сиквенс уникального штамма, изолированного от человека.

Разработана методика высокопроизводительного секвенирования геномов двухцепочечных РНК-содержащих вирусов.

Оценена целесообразность включения вируса Кемерово в систему надзора за ИПК.

Полученные результаты использованы в учебно-методической работе при подготовке специалистов биологического и медицинского профиля: включены в состав лекций в рамках семинара ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора «Инфекции, передающиеся клещами: современные требования и организация профилактических мероприятий».

### **Методология и методы исследования**

Методологическая основа работы построена в соответствии с поставленной целью исследования с учётом произведённого обзора научной литературы по теме диссертационного исследования. Проведённое исследование носило комплексный характер и осуществлялось с применением классических вирусологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и эпидемиологических методов.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Вирус Кемерово широко распространён на территории Российской Федерации и циркулирует в рамках глобального природного резервуара в лесных и лесостепных зонах умеренного пояса, являющихся естественными территориями обитания иксодид – переносчиков вируса.
2. Для вируса Кемерово показана способность к множественной внутривидовой сегментной реассортации, для вирусов Трибеч и Муко – способность к межвидовой сегментной реассортации.
3. Вирусы Кемерово, Трибеч и Муко обладают высоким уровнем нуклеотидной идентичности по последовательности субкорового белка VP3, что в сочетании с антигенным сходством, наличием общих переносчиков и возможности межвидовой реассортации позволяет рассматривать их как разные геноварианты одного вида.
4. Влияние альтернативных рамок считывания в сегменте 9 на репликативную активность вируса Кемерово в различных культурах клеток не доказано.

5. Вирус Кемерово обладает средним эпидемическим потенциалом, обусловленным широким ареалом распространения возбудителя, высоким уровнем его генетической изменчивости, поливекторностью и способностью транслоцироваться на большие расстояния в отсутствие регистрируемой заболеваемости, что делает целесообразным включение вируса Кемерово в систему мониторинга возбудителей ИПК.

#### **Личный вклад соискателя**

Планирование исследования проводилось при личном участии автора. Также автором внесён вклад в работы, предшествующие диссертационному исследованию: в изучение превалентности вируса Кемерово в популяциях иксодовых клещей на территории Российской Федерации и в оптимизацию метода пробоподготовки библиотек РНК-содержащих вирусов для высокопроизводительного секвенирования.

Основной объём исследования проведён автором работы самостоятельно. Непосредственно автором осуществлялось наращивание штаммов вируса Кемерово в культуре клеток, производилась экстракция РНК из высокотитражной вирусосодержащей культуральной жидкости, предварительная пробоподготовка для последующего секвенирования высокопроизводительными методами, количественный анализ репликационной активности вируса в культурах клеток. Также лично автором в полном объёме осуществлялась сборка геномов по референсной последовательности, сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей, их аннотация и депонирование в базу данных GenBank, систематизирование и эпидемиологическая оценка полученных данных.

Отдельные этапы работы, выполненные на базе научной группы геномной инженерии и биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, производились при участии сотрудников учреждения, и были поддержаны грантом РФ №17-74-20096, а также грантом РФФИ N. 19-34-50083.

Работа с коллекцией штаммов вируса Кемерово производилась на базе Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН») при участии сотрудников учреждения.

#### **Апробация результатов исследования**

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвященной 95-летию основания Омского научно-исследовательского института природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (15-16 ноября 2016 г. г. Омск); V Российском конгрессе лабораторной медицины (11-13

сентября 2018г. г.Москва); интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность» (6-8 октября 2020 г. г. Москва).

Апробация диссертации состоялась на заседании Ученого Совета ФБУН ««Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»» Роспотребнадзора 12.02.2020.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 7 статей в журналах из перечня ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science, глава в сборнике, 5 работ в сборниках научных трудов и материалах научно-практических конференций.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация представлена на 151 странице, включает 13 таблиц, 21 рисунок, 4 приложения. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения и обсуждения собственных результатов и выводов. Список использованных источников включает 150 единиц, из них 36 отечественных и 114 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе были использованы 10 штаммов вируса Кемерово из коллекции Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН»).

**Наращивание вируса в культуре и экстракция РНК.** Вирус Кемерово размножали в культуре клеток почки эмбриона свиньи версенезированных (СПЭВ) и культуре клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21) в течение 48-72 часов при 37°С до наступления ЦПД, затем вирусосодержащую культуральную жидкость отбирали для последующей экстракции вирусной РНК по-Хомчинскому.

**Пробоподготовка для секвенирования вируса *de novo*.** РНК исследуемых штаммов проходила специальную модификацию, включающую этапы избавления от балластной ДНК и оцРНК, неспецифическую обратную транскрипцию с помощью специальных петлевых адаптеров и амплификацию полученных фрагментов кДНК.

**Полногеномное секвенирование и сборка генома.** Высокопроизводительное секвенирование проводилось на коммерческой платформе Illumina (Illumina Inc., USA). Полученный массив данных картировался с помощью стандартных алгоритмов сборки на референсный геном (полногеномная последовательность штамма вируса Кемерово 21/10 (GenBank acc. nos. KC288130-KC288139)).

***In silico* анализ полученных последовательностей** производился с помощью пакета специализированных программ.

### Разработка критериев оценки эпидемического потенциала вирусов - возбудителей природно-очаговых инфекций.

В основу разработанной системы положена связь эпидемического потенциала с понятием эпидемиологической опасности, формирующей эпидемиологический риск, и складывающейся из опасностей источника инфекции, механизма передачи и восприимчивости макроорганизма. В рамках каждого звена эпидемического процесса выделены факторы, ранжированные в соответствии со значимостью с точки зрения реализации эпидемиологического риска с присвоением им балльной оценки (Таблица 1). Эпидемический потенциал вируса определяется суммой баллов по трём категориям, соотношение баллов между ними позволяет оценить ведущий фактор эпидемиологического риска.

1. При сумме баллов 24 и ниже – низкий эпидемический потенциал;
2. При сумме баллов от 25 до 44 – средний эпидемический потенциал;
3. При сумме баллов 45 и выше – высокий эпидемический потенциал.

Таблица 1. Критерии оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной природы

Опасность источника инфекции		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
1	2	3
Тип генетического материала вируса	(+) РНК	5
	Сегментированная (-)РНК и дцРНК	4
	Несегментированная (-) РНК	3
	оцДНК	2
	дцДНК	1
Дополнительные источники генетической изменчивости	Показана способность к межвидовой реассортации и/или рекомбинации	5
	Показана способность к внутривидовой реассортации и/или рекомбинации	4
	Показана межвидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	3
	Показана внутривидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	2
	Наличие реассортационных и/или рекомбинационных явлений у любого близкородственного вируса	1

1	2	3
Филогенетические взаимоотношения вируса с близкородственными представителями	Наличие в пределах рода возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	5
	Наличие в пределах рода представителей с доказанной патогенностью для человека	4
	Наличие в филогенетически близких родах возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	3
	Наличие в филогенетически близких родах представителей с доказанной патогенностью для человека	2
	Наличие в семействе патогенных представителей	1
Характеристика организмов-резервуаров инфекции	Полигостальность, включая птиц и рукокрылых	5
	Полигостальность, включая мелких млекопитающих, грызунов и диких хищников	4
	Полигостальность, включая КРС, МНС, свиней и диких копытных	3
	Моногостальность с повсеместным распространением	2
	Моногостальность с локальным распространением	1
<b>Опасность механизма передачи</b>		
<b>Фактор</b>	<b>Элементы фактора</b>	<b>Баллы</b>
Ведущий механизм передачи	Аспирационный	5
	Фекально-оральный	4
	Трансмиссивный поливекторный	3
	Трансмиссивный моновекторный	2
	Контактный	1
Характер взаимодействия человека с природным резервуаром инфекции	Постоянное взаимодействие всех групп населения с эпизоотическим очагом	5
	Регулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	4
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом среди различных групп населения	3
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	2
	Случайное взаимодействие с эпизоотическим очагом	1

1	2	3
Территориальная характеристика природного резервуара	Множественные очаги в различных природно-климатических зонах	5
	Множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны	4
	Локальные очаги большой территориальной протяжённости	3
	Множественные очаги малой территориальной протяжённости	2
	Единичные очаги малой территориальной протяжённости	1
Возможность передачи от человека к человеку	Формирует устойчивые антропоургические очаги за счёт передачи аспирационным или фекально-оральным путём	5
	Возможна аспирационная или фекально-оральная передача без формирования устойчивых антропоургических очагов	4
	Возможна контактная передача	3
	Возможна трансмиссивная передача	2
	Возможна вертикальная передача	1
<b>Опасность восприимчивости макроорганизма</b>		
<b>Фактор</b>	<b>Элементы фактора</b>	<b>Баллы</b>
Восприимчивый организм	Доказана патогенность для человека	5
	Доказана патогенность для млекопитающих - различных видов тест-организмов.	4
	Патогенен для определённого вида тест-организмов или только при определённом способе заражения	3
	Патогенен для новорожденных мышей, вызывает ЦПД на клетках	2
	Наличие патогенных близкородственных представителей	1
Обычная продолжительность инкубационного периода	Более 3 недель	5
	До трёх недель	4
	До двух недель	3
	От 5 дней до недели	2
	Менее 5 дней	1
Характер течения инфекционного процесса	Неманифестное (бессимптомное)	5
	Манифестное лёгкое	4
	Манифестное средней тяжести	3
	Манифестное тяжёлое	2
	Манифестное тяжёлое с летальным исходом	1
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы случаи пандемической заболеваемости	5
	Зарегистрированы случаи эпидемической заболеваемости	4

Продолжение таблицы 1

1	2			3
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы случаи вспышечной заболеваемости			3
	Зарегистрированы случаи спорадической заболеваемости			2
	Наличие серопревалентности при отсутствии заболеваемости			1

### Результаты исследования и их обсуждение

#### Получение геномных последовательностей штаммов вируса Кемерово.

Секвенированы и аннотированы полные геномы 9 штаммов вируса Кемерово: KEMV 61, KEMV k37, KEMV 101, KEMV 5/10, KEMV 106, KEMV k10, KEMV k37, KEMV 61, KEMV 483, геном штамма KEMVR10 секвенирован частично. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных GenBank (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристика исследуемых штаммов вируса Кемерово и номера доступа в базе данных Genbank

№	Вирус, штамм	Источник изоляции	Регион	Год изоляции	Номер доступа в Genbank
1	KEMV 61	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	1973	MF939485 – MF939494
2	KEMV 37	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	1973	MF939545 – MF939554
3	KEMV 101	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1970	MF939495 – MF939504
4	KEMV R10	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1962	MF939565 – MF939566
5	KEMV 5/1	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1969	MF939475 – MF939484
6	KEMV L75	Человек	РФ, Кемеровская область	1962	MF939555 – MF939564
7	KEMV 205	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Вологодская область	1974	MF939515 – MF939524
8	KEMV 483	<i>I. ricinus</i>	РФ, Вологодская область	1975	MF939525 – MF939534
9	KEMV 106	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Алтайский край	1973	MF939505 – MF939514
10	KEMV k10	<i>I. persulcatus</i>	РФ, Кемеровская область	1966	MF939535 – MF939544

**Сравнительное описание геномов штаммов вируса Кемерово.** Длины сегментов генома, их G+C состав и структура терминальных участков, а также положение и длина открытых рамок считывания свидетельствуют о принадлежности изучаемых штаммов к вирусу Кемерово и о тесном родстве с другими представителями группы Грейт-Айленд.

Вычислен процент нуклеотидной идентичности для сегментов генома штаммов вируса Кемерово. Самым вариабельным сегментом является четвёртый сегмент, кодирующий белок наружного слоя капсида (VP2) вирусной частицы, определяющей её антигенные свойства и вирулентность, что позволяет предположить наличие у разных штаммов вируса Кемерово отличительных особенностей взаимодействия с клеткой-хозяином. Самыми консервативными являются сегменты, кодирующие неструктурный белок NS1 и структурные белки VP3(T2) и VP5, формирующие соответственно субкоровый и наружный слой капсида.

Произведён анализ нуклеотидной идентичности штаммов вируса Кемерово и других представителей группы Грейт-Айленд по двум сегментам генома: первому, кодирующему РНК-зависимую РНК-полимеразу VP1 и второму, кодирующему основной субкоровый структурный белок VP3 (T2). Наибольший интерес представляют данные, полученные по второму сегменту, поскольку процент нуклеотидной идентичности орбивирусов по последовательности VP3 является одним из критериев видовой принадлежности. Штаммы вируса Кемерово продемонстрировали от 94,91 до 99,53% сходства друг с другом и от 95,74 до 99,32% сходства по отношению к референсному штамму EgAn-1169. Штаммы вируса Трибеч показывают от 93,20 до 98,62% нуклеотидной идентичности друг с другом, от 74,39 до 76,44% нуклеотидной идентичности со штаммами вируса Кемерово и от 91,69 до 93,09% нуклеотидной идентичности с вирусом Липовник. Нуклеотидная идентичность вирусов Муко и Трибеч по указанному сегменту составляет от 81,78 до 83,06%.

**Филогенетический анализ группы вирусов Грейт-Айленд.** Филогенетическая реконструкция нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов вируса Кемерово проведена по всем десяти сегментам генома, при этом использовались имеющиеся в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности других представителей группы Грейт-Айленд.

Филогенетическая реконструкция подтвердила, что вирус Кемерово формирует отдельную ветвь в пределах группы Грейт-Айленд, отличную от ветви, формируемой штаммами вируса Трибеч, в которую помимо собственно вируса Трибеч входит также вирус Муко. Наблюдаемое изменение топологии клад, образуемых штаммами вируса Кемерово для разных сегментов, свидетельствует о наличии явления множественной межсегментной реассортации. Для вируса Кемерово данное явление показано впервые (Рис.1).

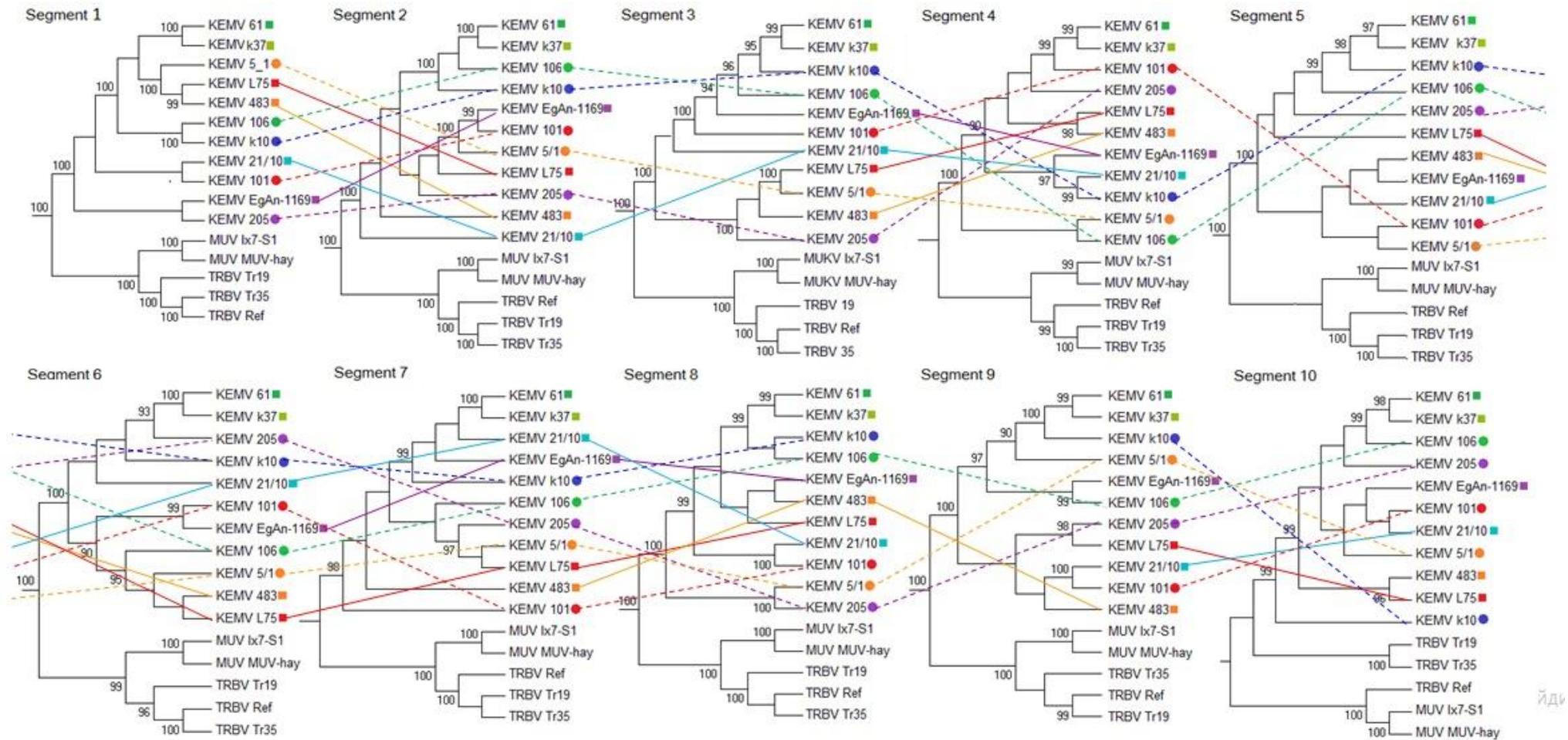


Рисунок 1. Филогенетическое дерево вирусов группы Грейт-Айленд, построенное на основании нуклеотидных последовательностей

Примечание: Филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) с использованием параметрической модели GTR (General Time-Reversible model) и оценкой гамма-распределения вариации частот между сайтами и долей инвариантных сайтов в последовательности с помощью ПО МЕГА версии 5.2. Деревья укоренены по геному вируса Грейт-Айленд (GIV, штамм CanAr 42; NC\_014522 – NC\_014531) (на рисунке не представлен). Достоверность топологии филогенетического дерева оценена с помощью 1000 бутстреп повторов. Положение штаммов вируса Кемерово на филогенетических деревьях отмечено точками, изменение местоположения обозначено сплошными и пунктирными линиями.

Филогенетическая реконструкция, выполненная с участием близкородственных представителей группы Грейт-Айленд, свидетельствует о наличии межвидовой сегментной реассортации между вирусами Трибеч и Муко, ранее не описанной (Рис.2)

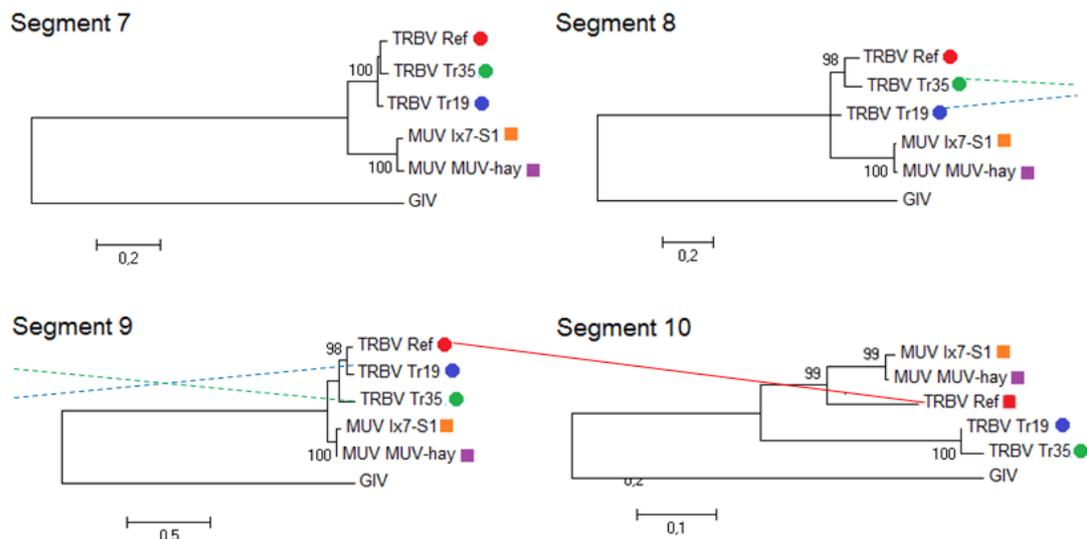


Рисунок 2. Филогенетическое дерево вирусов Трибеч (TRBV) и Муко (MUV), построенное на основании нуклеотидных последовательностей по сегментам 7, 8, 9 и 10.

Примечание: филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) с использованием параметрической модели GTR (General Time-Reversible model) и оценкой гамма-распределения вариации частот между сайтами и долей инвариантных сайтов в последовательности с помощью ПО МЕГА версии 5.2. Деревья укоренены по геному вируса Грейт-Айленд (GIV, штамм CanAr 42; NC\_014522 – NC\_014531). Достоверность топологии филогенетического дерева оценена с помощью 1000 бутстреп повторов. Положение штаммов вируса Трибеч и Муко на филогенетических деревьях отмечено точками, реассортация между штаммами вируса Трибеч обозначена пунктирными линиями, реассортация между штаммом вируса Трибеч TRBV Ref и вирусом Муко обозначена сплошной линией.

Способность обмениваться сегментами генома свойственна РНК-содержащим вирусам и является для них одним из важнейших источников генетической изменчивости. Вследствие чего формируется столь тесная взаимосвязь, продемонстрированная в ходе филогенетической реконструкции штаммами, выделенными в различные годы на различных территориях и из разных источников. Это наделяет изучаемые вирусы высоким потенциалом генетической изменчивости, который может приводить к возникновению иных реассортантных форм, к возврату или усилению его патогенных свойств, что делает вирус Кемерово потенциально опасным с точки зрения эпидемиологического благополучия населения, проживающего на эндемичных территориях.

Явлений рекомбинации в ходе исследования полученных геномных последовательностей обнаружено не было, однако это может быть связано с ограниченным числом исследованной выборки, которая не отражает состояния популяции возбудителя, а фактически представляет собой одномоментный срез с ограниченной степенью информативности.

**Альтернативные рамки считывания в сегменте 9 вируса Кемерово и их предполагаемое влияние на патогенность вируса.** Исследование альтернативных рамок считывания в 9 сегменте, кодирующем фермент хеликазу, показало, что исследуемые штаммы условно можно разделить на 2 группы по двум типам рамок: короткой и длинной. Также выявлена гетерогенность одного из штаммов – штамма k10 – по конфигурации альтернативной рамки. Примерно половина клонов штамма имела короткую рамку считывания, терминируемую опаловым стоп-кодоном, тогда как у другой половины опаловый стоп-кодон был заменён на аминокислоту и формировалась альтернативная рамка полной длины (Рис.3).

Существует гипотеза о роли подобных альтернативных рамок в определении клеточного тропизма и патогенности по отношению к млекопитающим, однако нами корреляции между конфигурацией альтернативной рамки и цитопатическими свойствами выявлено не было.

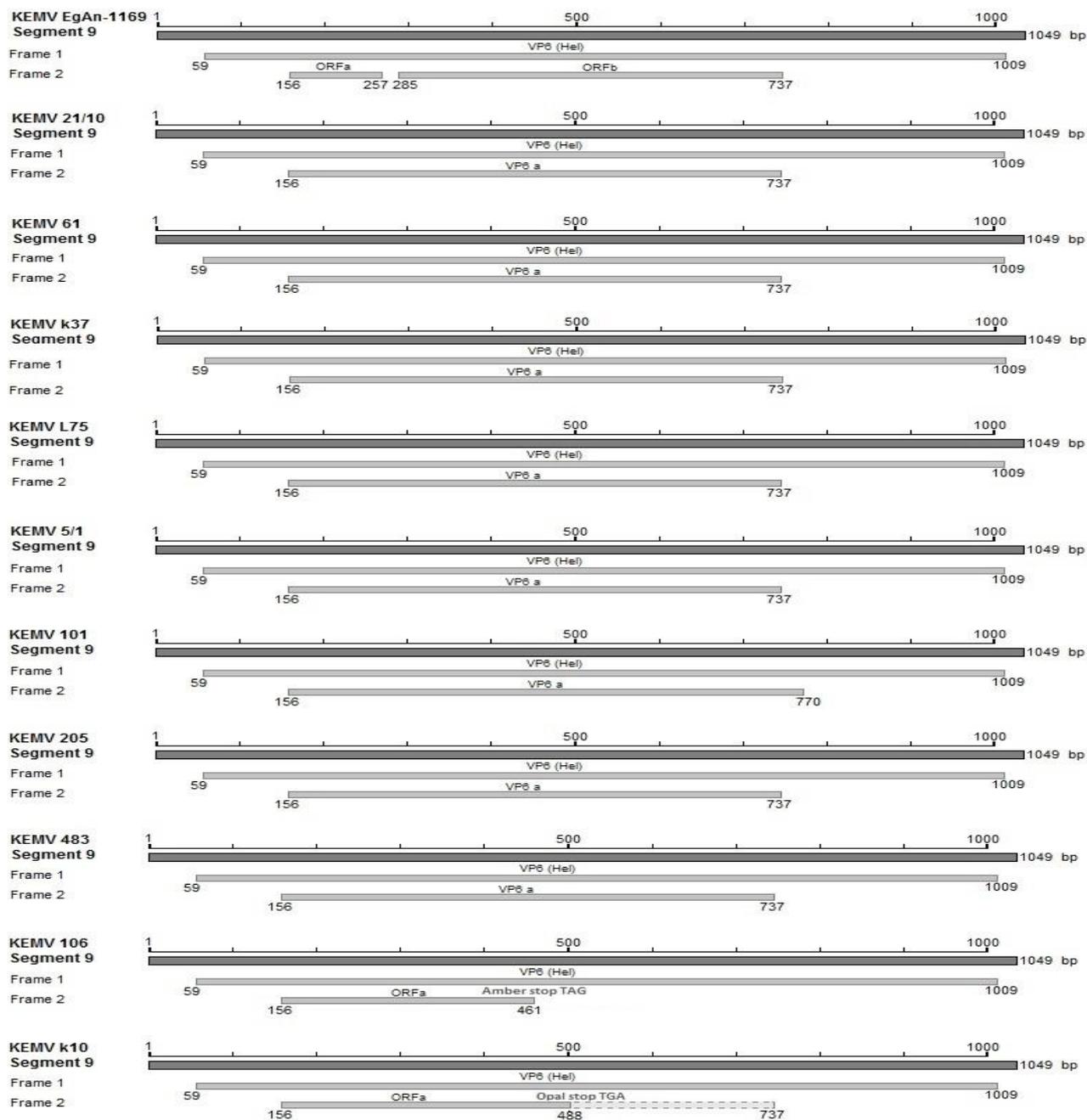


Рис. 3 Карта сегмента 9 генома для штаммов вируса Кемерово с обозначением местоположения альтернативных рамок считывания VP8a, по данным программы VectorNTI 11.0

**Определение видовой принадлежности вирусов группы Грейт-Айленд.** В соответствии с положениями IX Доклада Международного комитета по таксономии вирусов, более 76% нуклеотидной идентичности в последовательности сегмента, кодирующего ген субкорового белка T2 (VP3), является критерием принадлежности орбивирусов к одному виду, менее 74% - к разным видам (King *et al.*, 2012). Вирусы Трибеч и Муко не только имеют более 82% нуклеотидной идентичности по последовательности белка VP3, а также реассортируют друг с другом. Поэтому, согласно нуклеотидным критериям, их следует относить к одному виду. Вирусы Кемерово и Трибеч

также укладываются в заданные критерии принадлежности к одному виду. Ранее полученные данные о антигенном сходстве KEMV и TRBV (Gresikova *et al.*, 1965; Libikova *et al.*, 1965; Dedkov *et al.*, 2014a) и наличии общего переносчика (Dedkov *et al.*, 2014b) также говорят в пользу предположения о том, что вирусы Кемерово, Трибеч и Муко могут представлять собой один полиморфный вид, широко распространённый на территории Евразии – от Восточной Европы (TRBV), через территорию России и Дальний восток (KEMV), до островов Японии (MUV). Однако для окончательных выводов о таксономической принадлежности вирусов Кемерово и Трибеч необходимо проанализировать большее число штаммов, а также охарактеризовать возможность их симпатрической циркуляции и формирования реассортантных форм.

**Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово.** Для оценки эпидемического потенциала вируса в соответствии с разработанными критериями, обобщены и проанализированы известные данные по трём рассматриваемым группам факторов, участвующих в формировании эпидемиологической опасности. Согласно разработанным критериям, эпидемический потенциал вируса Кемерово оценён следующим образом (Таблица 3):

Таблица 3. Количественная оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово

<b>Опасность источника инфекции</b>		
<b>Фактор</b>	<b>Элементы фактора</b>	<b>Баллы</b>
1	2	3
Тип генетического материала вируса	Сегментированная (-)РНК и дцРНК	4
Дополнительные источники генетической изменчивости	Показана способность к внутривидовой реассортации и/или рекомбинации	4
Филогенетические взаимоотношения вируса с близкородственными представителями	Наличие в филогенетически близких родах возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	3
Характеристика организмов-резервуаров инфекции	Полигостальность, включая птиц и рукокрылых	5
Сумма по группе		16
<b>Опасность механизма передачи</b>		
<b>Фактор</b>	<b>Элементы фактора</b>	<b>Баллы</b>
Ведущий механизм передачи	Трансмиссивный поливекторный	3
Характер взаимодействия человека с природным резервуаром инфекции	Регулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно только для определённых групп населения	4

Продолжение таблицы 3

1	2	3
Территориальная характеристика природного резервуара	Множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны	4
Возможность передачи от человека к человеку	Передача от человека к человеку отсутствует или в настоящий момент не доказана	0
Сумма по группе		11
<b>Опасность восприимчивости макроорганизма</b>		
<b>Фактор</b>	<b>Элементы фактора</b>	<b>Баллы</b>
Восприимчивый организм	Доказана патогенность для человека	5
Обычная продолжительность инкубационного периода	От 5 дней до недели	2
Характер течения инфекционного процесса	Манифестное тяжёлое	2
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы единичные случаи заболевания	2
Сумма по группе		11
Итого по трём группам		38

Таким образом, эпидемический потенциал вируса Кемерово, полученный суммированием баллов по трём группам свойств, равен 38 (эпидемический потенциал  $KEMV = 16+11+11 = 38$ ) и может быть охарактеризован, как средний. Наиболее значимой составляющей эпидемического потенциала вируса Кемерово является первая группа свойств, характеризующая опасность источника возбудителя – 16 баллов из 20. Значимость свойств первой группы обусловлена строением генома вируса и механизмами формирования генетического разнообразия, что может приводить к возникновению высокопатогенных реассортантных форм. Меньшая значимость второй группы свойств обусловлена трансмиссивным механизмом передачи и относительно невысокой вероятностью его реализации среди населения, проживающего на эндемичных территориях. Третья группа свойств, характеризующая восприимчивость человека, по значимости сопоставима со второй, не смотря на тяжесть вызываемого вирусом заболевания. Основная причина этого – отсутствие в настоящий момент регистрируемой заболеваемости, поскольку последние подтверждённые случаи заболевания людей лихорадкой Кемерово были зафиксированы порядка полувека назад.

Таким образом, вирус Кемерово характеризуется широким ареалом распространения, поливекторностью, высоким уровнем генетической изменчивости вследствие внутривидовой, а потенциально, - и межвидовой межсегментной реассортации и способностью транслоцироваться на большие расстояния в ходе миграций птиц. Сочетание этих факторов в определённых условиях может приводить к возникновению заболеваемости и чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера,

несмотря на то, что в настоящий момент случаи лихорадки Кемерово не регистрируются. Поэтому в отношении вируса Кемерово целесообразно проведение мероприятий по надзору за ИПК, включающих систематический мониторинг очагов, исследование вирусоформности популяций переносчиков и организмов-резервуаров и других мероприятий, предусмотренных нормативной документацией в отношении предупреждения возникновения и распространения ИПК.

Для проверки предлагаемой системы оценки эпидемического потенциала дополнительно с помощью представленных критериев было проведено определение эпидемического потенциала ряда возбудителей природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи. Полученные значения эпидемического потенциала оцененных возбудителей природно-очаговых инфекций соответствуют современным представлениям об их эпидемиологической опасности.

Таким образом, предложенная система выявления эпидемического потенциала позволяет не только представить способность возбудителей к формированию эпидемического процесса в количественном выражении, но и сравнить эпидемический потенциал различных возбудителей между собой с оценкой вклада каждого из трёх компонентов в формирование эпидемиологической опасности. Система универсальна для природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи, и может служить дополнительным инструментом в оценке эпидемиологической опасности в случае угроз возникновения чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Как показало исследование с использованием литературных и собственных данных, вирус Кемерово широко распространён на территории Российской Федерации. Регионы его циркуляции формируют глобальный природный резервуар, охватывающий естественные территории обитания иксодид. При этом информация о циркуляции вируса Кемерово продолжает дополняться, благодаря тому, что исследования на вирус Кемерово начинают на постоянной основе входить в схему проведения скринингового исследования на ИПК клещей, собранных с территорий в различных регионах Российской Федерации.

Охарактеризованные в рамках настоящего исследования последовательности генома 10 штаммов вируса Кемерово позволили существенно обогатить объём знаний о его генетическом разнообразии и связях с близкородственными вирусами группы Грейт-Айленд, а также охарактеризовать вирус Кемерово, как возбудитель ИПК со средним эпидемическим потенциалом, что оправдывает дальнейшие исследования вируса. Наряду с этим необходимо включение вируса Кемерово в систему надзора за возбудителями ИПК, как потенциального возбудителя инфекционных заболеваний II группы патогенности, который может стать эпидемиологически значимым в будущем.

## ВЫВОДЫ

1. Вирус Кемерово (р. Orbivirus, сем. Reoviridae) широко распространен на территории Российской Федерации. При этом ареал циркуляции вируса представляет собой глобальный природный резервуар в лесных и лесостепных зонах умеренного пояса, являющихся естественными территориями обитания иксодид.
2. Методика приготовления геномных библиотек РНК-содержащих вирусов усовершенствована для проведения секвенирования высокопроизводительными методами с использованием платформ второго поколения, что позволяет с высокой точностью одновременно расшифровывать нуклеотидную последовательность для группы штаммов.
3. На основании филогенетического анализа установлена способность вируса Кемерово и других представителей группы Грейт-Айленд к внутри- и межвидовой сегментной реассортации.
4. Показатель нуклеотидной идентичности по сегменту 2 между вирусами Кемерово, Трибеч и Муко находится в диапазоне 74,39 – 99,53 %, что позволяет рассматривать их как разные геноварианты одного вида.
5. Влияние альтернативных рамок считывания в сегменте 9 на вирулентность вируса Кемерово не подтверждено.
6. Вирус Кемерово обладает средним эпидемическим потенциалом, в соответствии с разработанной шкалой оценки эпидемического потенциала, обусловленным широким ареалом распространения вируса, высоким уровнем генетической изменчивости, поливекторностью и способностью транслоцироваться на большие расстояния в отсутствие регистрируемой заболеваемости, что делает целесообразным включение вируса Кемерово с систему надзора за инфекциями, передающимися клещами..

### Список публикаций по теме исследования

#### Статьи в рецензируемых журналах

1. Characterization of two strains of Tribeč virus isolated in Ukraine / V.G. Dedkov, D.A. Dubina, O.A. Yurchenko, **M.V. Bekova**, A.V. Valdokhina, G.A. Shipulin // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2014. – Vol.14, №11. – P. 808-816. DOI: 10.1089/vbz.2014.1683
2. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation / V.G. Dedkov, M.L. Markelov, K.A. Gridneva, **M.V. Bekova**, A.P. Gmyl, L.I. Kozlovskaya, G.G. Karganova, L.Iu. Romanova, V.V. Pogodina, V.V. Yakimenko, G.A. Shipulin // Ticks Tick Borne Dis. – 2014. – Vol.5, №6. – P. 651-655. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.017

3. Обнаружение вируса Кемерово в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных в Алтайском крае / В.Г. Дедков, А.А. Девяткин, **М.В. Бекова**, М.Л. Маркелов, О.В. Бесхлебова, В.М. Гранитов, С.Н. Шпынов, А.П. Гмыль, Г.А. Шипулин // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2014. – Вып.6,№79 – С. 46-50.
4. The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia / V.G. Dedkov, E.G. Simonova, O.V. Beshlebova, **M.V. Safonova**, O.A. Stukolova, E.V. Verigina, G.V. Savinov, I.P. Karaseva, E.A. Blinova, V.M. Granitov, I.V. Arsenjeva, G.A. Shipulin // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2017. – Vol.8,№5. – P. 787-794. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.06.004>
5. Анализ генетического разнообразия вируса Кемерово и его филогенетические связи с вирусами группы Грейт-Айленд / **М.В. Сафонова**, В.Г. Дедков, А.П. Гмыль, Г.Г. Карганова, А.С. Сперанская, А.Д. Неверов, Г.Г. Федонин, Е.В. Пимкина, А.В. Валдохина, К.Ф. Хафизов, Е.Н. Самохина, Г.А. Шипулин // *Эпидемиология и инфекционные болезни: Актуальные вопросы*. – 2018. – №2. – С. 17-27. DOI: 10.18565/epidem.2018.2.17-27
6. Выявление "новых" возбудителей очаговых инфекций в иксодовых клещах на территории Тульской области / Т.В. Козлова, Т.И. Хомякова, В.Г. Дедков, **М.В. Сафонова**, Л.С. Карань, Я.Е. Григорьева, В.В. Козлов, А.А. Лопатин, С.М. Иванова, Ю.Н. Хомяков // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2018. – Вып.4,№23. – С. 172-177. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-4-172-177
7. Genetic diversity of Kemerovo virus and phylogenetic relationships within the Great Island virus genetic group / **M.V. Safonova**, A.P. Gmyl, G.G. Karganova, A.N. Lukashev, A.S. Speranskaya, A.D. Neverov, G.G. Fedonin, E.V. Pimkina, A.D. Matsvay, K.F. Khafizov, L.I. Kozlovskaya, A.V. Valdokhina, V.P. Bulanenko, V.G. Dedkov // *Ticks and Tick-borne diseases*. – 2020. – Vol.11,№2. – 101333. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.101333

#### Главы в сборниках

1. Universal Library Preparation Protocol for Efficient High-Throughput Sequencing of Double-Stranded RNA Viruses / A.S. Dolgova, **M.V. Safonova**, V.G. Dedkov // *Methods Mol Biol* – 2020. – 2063. – P. 181-188. DOI:

#### Тезисы докладов и материалы конференций

1. Секвенирование и генетическая характеристика двух штаммов вируса Трибеч / В.Г. Дедков, **М.В. Бекова**, А.В. Валдохина, М.Л. Маркелов, Д.А. Дубина, О.А. Юрченко, Г.А. Шипулин // *Сб. трудов колл. авт., под ред. В.И. Покровского*. – Т. 1 – М., ООО "Издательство МБА", 2014. – 560 с.
2. Изучение генетического разнообразия вируса Кемерово / **М.В. Сафонова**, В.Г. Дедков, А.П. Гмыль, Г.Г. Карганова, А.С. Сперанская, А.Д. Неверов, Г.Г. Федонин, А.В. Валдохина, Е.В. Пимкина, М.Л. Маркелов, Г.А. Шипулин // *Национальные приоритеты России*. – 2016. – Вып.22,№4. – С. 100-103.

3. Рекомбинация и реассортация как источники генетического разнообразия вируса Кемерово / **М.В. Сафонова**, В.Г. Дедков, А.С. Сперанская, А.Д. Неверов, Г.Г. Федонин, А.П. Гмыль, Г.Г. Карганова, А.В. Валдохина, Е.В. Пимкина, Г.А. Шипулин // Молекулярная диагностика. Сб.трудовколл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2 – Тамбов, ООО фирма "Юлис", 2017. – 528 с.
4. Рекомбинация и реассортация как источники генетического разнообразия вируса Кемерово / **М.В. Сафонова**, В.Г. Дедков, А.С. Сперанская, А.Д. Неверов, Г.Г. Федонин, А.П. Гмыль, Г.Г. Карганова, А.В. Валдохина, Е.В. Пимкина, Г.А. Шипулин // Молекулярная диагностика. Сб.трудовколл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2 – Тамбов, ООО фирма "Юлис", 2017. – 528 с.
5. Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово на основании данных о его генетическом разнообразии / **М.В. Сафонова**, Е.Г. Симонова, В.Г. Дедков // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (6–8 октября 2020 года): сборник материалов, под ред. акад. РАН, проф., д.м.н. В.Г. Акимкина, проф., д.б.н. М.Г. Твороговой. — М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. — 256 с.

Автор выражает благодарность сотрудникам ФГБНУ «ФНЦИРИП им. Чумакова РАН» в лице заведующей лабораторией биологии арбовирусов, доктору медицинских наук, профессору Каргановой Галине Григорьевне и заведующей отделом актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом и лабораторией вирусологии полиомиелита и других энтеровирусных инфекций – референс-центра ВОЗ по надзору за полиомиелитом, кандидату биологических наук, Козловской Любови Игоревне за неоценимую помощь в работе с коллекцией штаммов вируса Кемерово.

Автор выражает благодарность директору Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, доктору медицинских наук, Члену – Корреспонденту РАН Лукашеву Александру Николаевичу за помощь в проведении анализа данных высокопроизводительного секвенирования и интерпретации полученных результатов.

Автор выражает благодарность заведующей лабораторией молекулярной генетики патогенных микроорганизмов отдела эпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, кандидату биологических наук Долговой Анне Сергеевне за помощь в написании диссертации и многочисленные ценные советы.