

5. Смирнов В. С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. – СПб.: ФАРМИНдекс, 2010.
6. Хавинсон В. Х., Синакевич Н. В., Серый С. В. Тимоген. – СПб., 1991.
7. Clark N. M., Lynch J. R. Influenza: epidemiology, clinical features, therapy, and prevention // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 32, N 4. – P. 373–392.
8. Darwish I., Mubareka S., Liles W. C. Immunomodulatory therapy for severe influenza // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2011. – Vol. 9, N 7. – P. 807–822.
9. Kent J. H., Chapman L. E., Schmeltz L. M. et al. Influenza surveillance – United States, 1991–1992 // *Morbid. Mortal. Wkly Rep.* – 1992. – Vol. 41. – P. 35–46.
10. Madjid M., Miller C. C., Zarubaev V. V. et al. Influenza epidemics and acute respiratory disease activity are associated with a surge in autopsy-confirmed coronary heart disease death: results from 8 years of autopsies in 34 892 subjects // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol. 28, N 10. – P. 1205–1210.
11. Perotta D. M., Decker M., Glesen W. P. Acute respiratory disease hospitalization as a measure of impact of epidemic influenza // *Am. J. Epidemiol.* – 1985. – Vol. 122. – P. 468–476.
12. Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 32, N 4. – P. 409–422.
13. Schrofelbauer B., Raffetseder J., Haunter M. et al. Glycyrrhizin, the main active compound in licorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 421, N 3. – P. 473–482.
14. Upton D. A., Aoki F. Y., Stiver H. G. The use of antiviral drugs for influenza: Recommended guidelines for practitioners // *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 17, N 5. – P. 273–284.
15. Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R. B., Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus // *Antimicrob. Chemother.* – 1997. – Vol. 41, N 3. – P. 551–556.

Поступила 30.11.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.833.1:578.53].083.2:577.21.08

К. Е. Кузьмина, А. Д. Забережный, А. М. Бутенко

Молекулярно-генетический анализ штаммов вируса Тягиня

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития, Москва

Определена частичная нуклеотидная последовательность S- и M-сегментов генома у 13 малоизученных штаммов вируса Тягиня (*Bunyaviridae*, *Bunyavirus*, серогруппа калифорнийского энцефалита), выделенных на территории Чехословакии, Финляндии, Армении, Азербайджана, Казахстана и Таджикистана. Филогенетический анализ показал, что исследованные штаммы формируют две группы с четкой географической привязкой – европейскую и азиатскую.

Ключевые слова: вирус Тягиня, филогенетический анализ

Molecular genetic analysis of Tahyna virus strains

К. Е. Kuzmina, А. D. Zaberezhnyi, А. М. Butenko

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow

The partial nucleotide sequence of S and M genome segments was identified in 13 little studied Tahyna virus (*Bunyaviridae*, *Bunyavirus*, California encephalitis serogroup) strains isolated in Czechoslovakia, Finland, Armenia, Azerbaijan, Kazakhstan, and Tajikistan. A phylogenetic analysis indicated that the examined strains form two groups with a geographical connection: European and Asian genetic groups.

Key words: *Tahyna virus*, phylogenetic analysis

Вирус Тягиня, относящийся к роду *Bunyavirus* семейства *Bunyaviridae*, был впервые выделен в Чехословакии в 1958 г. [5]. Он входит в состав серокомплекса вируса калифорнийского энцефалита, к которому относятся также вирусы Инко, зайца-беляка и др. [9]. Переносчиками вируса Тягиня являются комары.

Вирус распространен в Восточной и Западной Европе, Закавказье, странах Средней Азии, Китае и Африке [4, 9]. Установлена его активная циркуляция в южных регионах России. Наиболее напряженные очаги лихорадки Тягиня находятся в Астраханской области в дельте Волги [2]. Доказана циркуляция вируса в Волгоградской, Саратовской, Ростовской, Московской, Рязанской областях, Калмыкии и других регионах [7, 8].

Вирус Тягиня вызывает заболевание, протекающее как без поражения ЦНС (92,5%), так и с синдромом острой нейроинфекции (редко). Инкубационный период составляет 3–7 дней. Полиорганный характер поражения в

результате вовлечения в патологический процесс бронхолегочной системы, почек, печени, ЦНС свидетельствует о возможности генерализации инфекции [1, 2].

Вирус Тягиня является оболочечным со спиральным строением нуклеокапсида, имеет сферическую форму. На поверхности в равных количествах присутствуют два структурных гликопротеина – G_n и G_s. Геном вируса состоит из 3 сегментов однитчатой РНК негативной полярности – S, M и L – и имеет организацию, характерную для всех буньявирусов. L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу. M-сегмент кодирует полипротеин, включающий в себя гликопротеины G_n и G_s и неструктурный белок NS_m. S-сегмент – нуклеокапсидный N-белок и неструктурный белок NS_s в перекрывающихся рамках считывания [6, 11, 12].

Наличие сегментированного генома, одновременная активность в эндемичном районе двух или нескольких

Контактная информация:
Кузьмина Ксения Евгеньевна, науч. сотр.; e-mail: arboelisa@mail.ru

Таблица 1

Использованные в работе штаммы вируса Тягиня

| Штамм | Место выделения | Источник выделения | Год выделения |
|----------|-----------------|---|---------------|
| Az-F | Азербайджан | <i>Aedes vexans</i> | 1978 |
| Yerevan | Армения | <i>Anopheles maculipennis</i> <i>Culex pipiens</i> | 1990 |
| P6b | Чехословакия | Кровь больного | 1975 |
| T-16 | " | " " | 1974 |
| CT-39 | " | <i>Culicoides sp.</i> | 1986 |
| La 65 | " | <i>Culiseta annulata LL</i> | 1974 |
| 129 M3 | " | * | * |
| 251 H2 | " | * | * |
| 2014 M3 | " | * | * |
| 7643 M3 | " | <i>Aedes sticticus</i> | 1975 |
| 2008 | Финляндия | * | * |
| 525 | Таджикистан | <i>Aedes caspius</i> | 1986 |
| Kaz-5957 | Казахстан | <i>Anopheles maculipennis</i> | 1987 |

Примечание. * – сведения о выделении отсутствуют.

близких буньявирусов, общность видового состава их естественных переносчиков и резервуаров создают реальные предпосылки для появления генетически измененных вариантов штаммов вируса Тягиня [10].

Ранее филогенетический анализ штаммов вируса Тягиня был выполнен в основном для штаммов, циркулирующих в Чехословакии и Китае. Нуклеотидные последовательности штаммов из других регионов в базе данных GenBank отсутствуют.

Цель настоящего исследования заключалась в молекулярно-генетической характеристике малоизученных штаммов вируса Тягиня, изолированных из комаров и крови больных на территориях европейских и азиатских стран, и выяснении их таксономического положения. На основании филогенети-

ческого анализа последовательностей сегментов S и M нами построены дендрограммы, которые демонстрируют разделение исследуемых штаммов по географическому признаку.

Материалы и методы

В работе использовали 13 штаммов вируса Тягиня из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Иванова (табл. 1), ранее идентифицированных как штаммы вируса Тягиня с помощью серологических методов (реакции связывания комплемента, метода флюоресцирующих антител, реакции нейтрализации, иммуноферментного анализа и лантаноидного иммуноферментного анализа) [3].

Все штаммы прошли серию пассажей на 2-дневных мышцах-сосунках при внутримозговом заражении.

Вирусную РНК выделяли из мозговой ткани мышечных-сосунков с применением Trizol Reagent ("Life Technology", США) по методике производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием праймеров Random6 ("Синтол", Россия) и обратной транскриптазы (M-MLV, "Sigma", США) по методике производителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли на амплификаторе Терцик ("ДНК-технология", Россия) в одностадийном варианте. В работе использовали синтетические олигонуклеотиды ("Синтол", Россия). Праймеры подбирали с помощью программы PriemerPremier5 ("Priemer Biosoft International", США) с использованием нуклеотидных последовательностей из базы данных GenBank. Последовательность праймеров и их назначение приведены в табл. 2.

Амплификацию фрагментов генома исследуемых штаммов вируса Тягиня выполняли в следующем режиме: 94°C, 5 мин – 1 цикл; (94°C – 15 с, 57°C – 15 с, 72°C – 20 с) – 30 циклов; 72°C, 7 мин – 1 цикл.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 ("Applied Biosystems", США) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 ("Applied Biosystems", США).

При выравнивании нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей использовали пакет программ Lasergene ("DNASTAR", США).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили на основе алгоритма "ближайшего соседа" в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры в программе MegAlign ("DNASTAR", США).

Результаты и обсуждение

Для амплификации фрагментов генома исследованных штаммов были использованы олигонуклеотидные праймеры, подобранные по представленным в базе данных GenBank нуклеотидным последовательностям вируса Тягиня. Методом ПЦР были получены нуклео-

Таблица 2

Первичная структура олигонуклеотидов, использованных в работе

| Сегмент вирусного генома | № | Нуклеотидная последовательность 5' → 3' | Назначение |
|--------------------------|----|---|---------------------|
| S | 1 | TGG CTA GAT GGG TGC TAG AGC | Секвенирование |
| | 2 | TTG TGG GCT CTT GGG GAA C | Секвенирование, ПЦР |
| | 3 | TTT GTC ATT ACT TGA GAT ACC GA | " " |
| | 4 | AAA CAT TTC TGT GCC (T/C)GG GA | Секвенирование |
| M | 5 | AAA GTC AAT TCA CAA GTT CCA | Секвенирование, ПЦР |
| | 6 | TAT AGA TTT AGG CCC ACA AGA | Секвенирование |
| | 7 | GCA CAA CTT ATA TCA CCC TTG | " |
| | 8 | TAG ATA AAA TAG AAG CTG GCC | " |
| | 9 | GGG AGT GAC AAA AGT AAG GAT | Секвенирование, ПЦР |
| | 10 | TAA TGG AGA CTT CAC AAA CAA | " " |
| | 11 | TGT TTA AGT TGG GTG TAC TCA | " " |
| | 12 | CCT TAC ACC ACG CAT TTA GAG | Секвенирование |
| | 13 | CGT GGG ATC TCA AGT AAA CC | " |
| | 14 | TCC AAA GGG CCA GCT T | Секвенирование, ПЦР |
| | 15 | TAT ATC CGC CTC ACC ACT | " " |

тидные последовательности S-сегмента, соответствующие открытой рамке считывания (708 п. н.), и фрагменты М-сегмента (2550 п. н., начиная с АТG-кодона), кодирующие белки Gp, NSm и Gc (частично).

Нуклеотидные последовательности сегментов S и М исследуемых штаммов были выровнены с соответствующими нуклеотидными последовательностями вирусов Тягиня и Лумбо из базы данных GenBank.

Филогенетический анализ по нуклеотидным последовательностям участка М-сегмента показал высокую степень филогенетического родства исследованных штаммов с прототипным штаммом Bardos вируса Тягиня (HM036209). При этом оказалось возможным выделить две группы штаммов: штаммы из Азии (Казахстан, Таджикистан и Азербайджан) со степенью филогенетического родства со штаммом Bardos, в среднем соответствующей 95% гомологии, и группу европейских штаммов со степенью филогенетического родства со штаммом Bardos, соответствующей 98,4–99,9% гомологии (рис. 1). В качестве дополнительного критерия была использована степень филогенетического родства между исследуемыми штаммами вируса Тягиня и вирусом Лумбо, которая соответствовала 79,1–80,1% гомологии; исследуемыми штаммами и штаммом XJ0708 вируса Тягиня, выделенным в Китае (представлен в базе данных GenBank), которая соответствовала 79,4–80,1% гомологии (при этом степень филогенетического родства вируса Лумбо и штамма XJ0708 вируса Тягиня соответствовала 79,1% гомологии).

Анализ последовательностей по участкам S-сегмента, соответствующих нуклеокапсидному N-белку (от АТG до стоп-кодона), также показал высокую степень филогенетического родства исследованных штаммов с прототипным штаммом Bardos (HM036208) и разделение их на две группы – европейскую и азиатскую (рис. 2).

Филогенетический анализ по нуклеотидным последовательностям участка S-сегмента, соответствующего неструктурному белку NSs (сдвиг рамки считывания, от АТG до стоп-кодона, 294 п. н.), дал не-

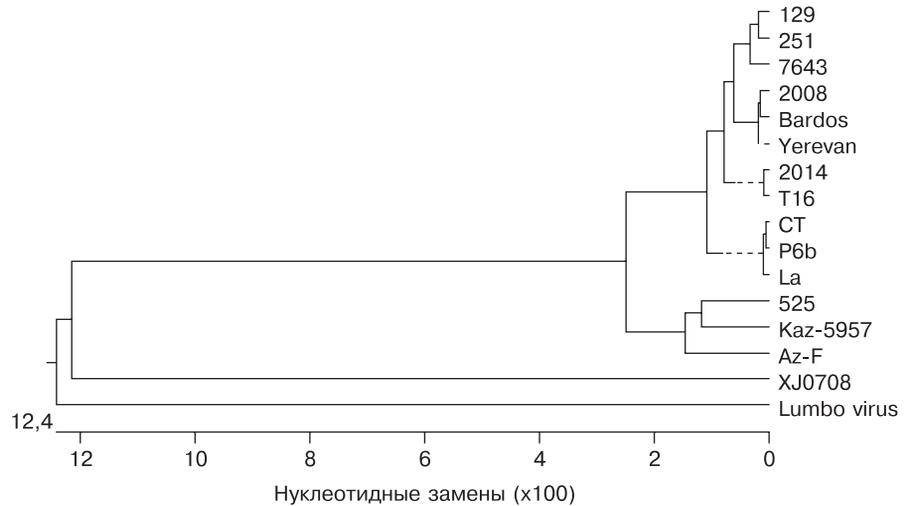


Рис. 1. Дендрограмма, показывающая степень филогенетического родства исследованных штаммов, основанная на анализе нуклеотидной последовательности участка гена, кодирующего полипротеин (2550 п. н., М-сегмент).

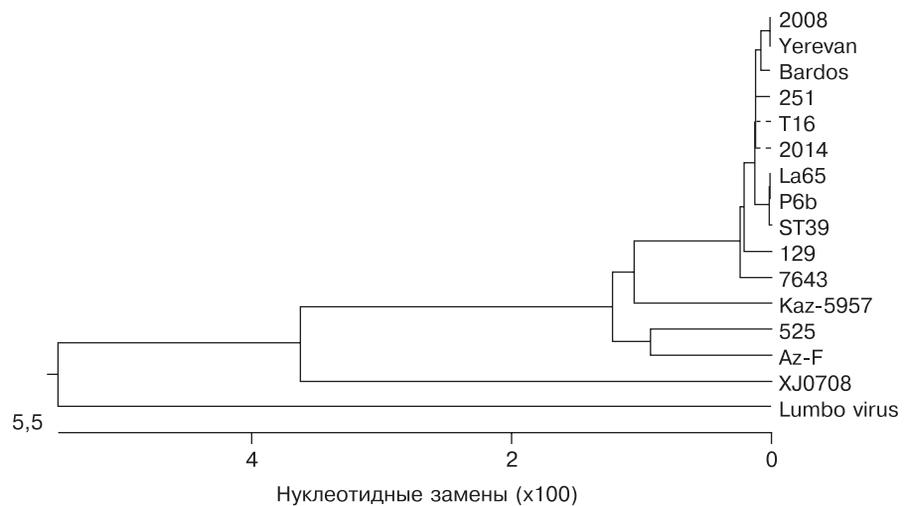


Рис. 2. Дендрограмма, показывающая степень филогенетического родства исследованных штаммов, основанная на анализе нуклеотидной последовательности гена, кодирующего нуклеокапсидный белок N (708 п. н., S-сегмент).



Рис. 3. Дендрограмма, показывающая степень филогенетического родства исследованных штаммов, основанная на анализе нуклеотидной последовательности гена, кодирующего неструктурный белок NSs (294 п. н., S-сегмент).

сколько иную картину. Исследуемые штаммы также формируют две группы (рис. 3), как и в случае анализа последовательностей, соответствующих структурному N-белку S-сегмента. Одна группа представлена европейскими штаммами со 100% идентичностью прототипному штамму Bardos. К другой группе, помимо штаммов из Казахстана, Таджикистана и Азербайджана, относится также китайский штамм XJ0708 со степенью филогенетического родства с прототипным штаммом Bardos, соответствующей около 98,5% гомологии. При этом каждый из исследованных азиатских штаммов оказался уникальным как по нуклеотидной, так и по аминокислотной последовательности.

Из результатов филогенетического анализа, проведенного по кодирующим нуклеотидным последовательностям S-сегмента, а также по участкам M-сегмента, видно, что все исследуемые штаммы достаточно близки прототипному штамму Bardos и являются штаммами вируса Тягиня.

В данной работе мы сравнили также нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов между собой по сегментам генома S и M. Результаты анализа по нуклеотидным последовательностям S-сегмента (без 3'- и 5'-нетранслируемых областей), а также по участкам M-сегмента показали, что штаммы разделились на две группы (см. рис. 1–3). В первую группу вошли штаммы, выделенные в Чехословакии, Финляндии и Армении, – P6b, T-16, CT-39, La 65, 129 M3, 251 H2, 2014 M3, 7643 M3, 2008, Yerevan. Вторая группа представлена штаммами, выделенными в Азии, – Az-F, Kaz-5957, 525.

Таким образом, проведенные исследования показали, что географические изоляты следует рассматривать как варианты вируса Тягиня. Исследуемые штаммы разделились по географическому признаку; штаммы, формирующие отдельную азиатскую генетическую группу, существенно отличаются от штаммов, циркулирующих в Европе.

Авторы выражают глубокую благодарность В. Л. Громашевскому, З. Губалеку, В. А. Казаряну, Я. Капецки, С. К. Каримову и Отделу вирусологии Хельсинкского университета за предоставление использованных в данной работе штаммов вируса Тягиня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демихов В. Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний, вызываемых вирусами Инк и Тягиня (по результатам исследований, выполненных в Рязанской области): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.; Рязань, 1992.
2. Колобухина Л. В., Львов С. Д. Калифорнийский энцефалит // Медицинская вирусология / Под ред. Д. К. Львова. – М.: МИА, 2008. – С. 540–541.
3. Лебедева С. Д. Вирусы калифорнийской серогруппы (Bunyaviridae, Bunyavirus): антигенная классификация и идентификация малоизученных штаммов: Дис. ... канд. биол. наук. – М., 1994.
4. Львов Д. К., Клименко С. М., Гайдамович С. Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. – М.: Медицина, 1989. – С. 212–214.
5. Bardos V., Danielova V. The Tahyna virus – a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Praha). – 1959. – Vol. 3. – P. 264–276.
6. Bishop D. H. L. Molecular biology of Bunyaviruses and Phleboviruses // Abstracts of the 2-nd Symposium on Arboviruses in Mediterranean Countries. – Dubrovnik, 1989.
7. Butenko A. M., Galkina I. V., Kusnetsov A. A. et al. Serological evidence of the distribution of California serogroup viruses in the USSR // Arch. Virol. – 1990. – Suppl. 1. – P. 235–241.
8. Butenko A., Lvov D., Kolobukhina L. Arboviruses of the genus Bunyavirus (family Bunyaviridae) and caused illnesses in the former USSR // Sov. Med. Rev. E: Virology Reviews. – 1993. – Vol. 5. – P. 77–135.
9. Calisher C. H. Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup Bunyaviruses // Prog. Clin. Biol. Res. – 1983. – Vol. 123. – P. 1–16.
10. Chandler L. J., Hogge G. et al. Reassortment of La Crosse ad Tahyna Bunyaviruses in Aedes triseriatus mosquitoes // Virus Res. – 1991. – Vol. 20, N 2. – P. 181–191.
11. Fazakerley J. K., Gonzales-Scarano F. et al. Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare Bunyavirus // Virology. – 1988. – Vol. 167. – P. 422–432.
12. Fuller F., Brown A. S., Bishop D. H. Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSs, are coded by overlapping reading frames in the S RNS // J. Gen. Virol. – 1983. – Vol. 64, Pt 8. – P. 1705–1714.

Поступила 24.11.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.833.26:578.53].083.2

**В. В. Погодина¹, Л. С. Карань², Н. М. Колясникова¹, С. Г. Герасимов¹, Л. С. Левина¹, Н. Г. Бочкова¹,
Е. И. Андаев³, А. Г. Трухина³, Т. И. Борисова³, Е. А. Сидорова³, О. А. Нагибина³, Г. В. Маленко¹, Е. Г. Безрукова¹**

Политиповые штаммы в генофонде вируса клещевого энцефалита

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Московская обл.; ²ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, Москва; ³Иркутский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора

В европейской и азиатской частях ареала клещевого энцефалита (КЭ) изолированы 18 микстштаммов, содержащих фрагменты генов белков E и NS1 сибирского и дальневосточного, иногда сибирского и европейского подтипов вируса КЭ (ВКЭ). Детекция проведена в ПЦР в реальном времени гибридационно-флюоресцентным методом с гентипспецифическими зондами, методом анализа длин рестрикционных фрагментов и секвенированием E-гена. Микстштаммы изолированы из отдельных клещей *Ixodes persulcatus*, пулов *I. persulcatus* и из крови больных и мозга умерших пациентов. Частота изоляции микстштаммов в зоне симпатрии разных подтипов ВКЭ колеблется от 4,4% (Иркутская область) до 15,1% (Ярославская область). В Забайкальском крае, помимо 2 микстштаммов, изолирован штамм, подобный 886-84-варианту ВКЭ. Подтипы ВКЭ, входящие в состав микстштаммов, находятся в негенетическом взаимодействии – нейтрализме и конкуренции. Микстштаммы стабильны при пассажах в культуре клеток СПЭВ и клонировании. Пассажи через мозг мышей способствуют диссоциации микстштаммов. Обсуждаются условия формирования микстштаммов и их роль в этиологии КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, генофонд, политиповые штаммы, смешанная инфекция

Контактная информация:

Погодина Ванда Вацлавовна, д-р мед. наук, проф., зав. лаб.; e-mail: pogodina_v_v@mail.ru