

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко А. М. Крымская геморрагическая лихорадка // Покровский В. И., Онищенко Г. Г., Черкасский Б. Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. – М.: Медицина, 2003. – С. 365–376.
2. Зимица Ю. В., Куликова А. И., Салько В. Н., Ковтунов А. И. Иксодовые клещи Астраханской области, их роль в формировании природных очагов и передачи арбовирусов человеку // Вопросы риккетсиологии и вирусологии: Сборник науч. трудов. – Астрахань; М., 1996. – С. 58–59.
3. Львов Д. К., Бутенко А. М. Крымская геморрагическая лихорадка // Арбовирусы и арбовирусные инфекции. – М., 1989. – С. 236.
4. Малеев В. В., Галимзянов Х. М., Бутенко А. М., Чернов И. В. Крымская геморрагическая лихорадка. – М.; Астрахань, 2003.
5. Москвитина Э. А., Водяницкая С. Ю., Ломов Ю. М. и др. Современное состояние природного очага крымской геморрагической лихорадки в Ростовской области // Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Материалы пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и науч.-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17–20 октября 2006 г. – М., 2007. – С. 128–132.
6. Топорков А. В., Кабин В. В., Тарасов М. А. и др. Организационно-методические аспекты обследования сочетанных очагов особо опасных арбовирусных и бактериальных инфекций (на примере Среднего и Нижнего Поволжья) // Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Материалы пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и науч.-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17–20 октября 2006 г. – М., 2007. – С. 147–149.

Поступила 24.11.11

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.833.26:578.53].083.2:577.21.08

О. А. Юрченко¹, Н. А. Виноград², Д. А. Дубина¹

Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Крыму

¹ГУ Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И. И. Мечникова, Одесса;

²Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, Украина

Проведено определение нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки E трех штаммов ВКЭ 80, 85 и 290, изолированных из иксодовых клещей *Ixodes ricinus* в Крыму в 1989–1990 гг. Сравнительный анализ генетической структуры штаммов показал их идентичность. Филогенетический анализ этих штаммов с 34 другими штаммами ВКЭ позволил отнести их к европейскому генотипу вируса с максимальной идентичностью штамму Pan (97,24%), занимающему обособленное положение среди секвенированных штаммов ВКЭ. Полученные результаты указывают на то, что в 1980–1990 гг. в Крыму наряду с дальневосточным генотипом ВКЭ циркулировали штаммы европейского генотипа.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, ген белка оболочки E, секвенирование

Molecular genetic characteristics of tick-borne encephalitis virus in the Crimea

O. A. Yurchenko¹, N. A. Vinograd², D. A. Dubina¹

¹I. I. Mechnikov Ukrainian Anti-Plague Research Institute, Odessa; ²Danila Galitsky Lvov National Medical University, Ukraine

The nucleotide sequences of the envelope (E) protein gene of three tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains 80, 85, and 290 isolated from *Ixodes ricinus* ticks in the Crimea in 1989–1990 were determined. A comparative analysis of the genetic structure of the strains showed their identity. A phylogenetic analysis of these strains with 34 other TBEV strains could assign them to the European genotype and showed their maximum (97.24%) identity to the Pan strain that occupies a separate position among the sequenced TBEV strains. The findings indicate that the TBEV European genotype strains circulated together with the TBEV Far Eastern genotype ones in the Crimea in 1980–1990.

Key words: tick-borne encephalitis virus, envelope (E) protein gene, sequencing

Прогресс в изучении проблемы клещевого энцефалита (КЭ) в значительной мере обусловлен использованием молекулярно-генетических методов. Разработаны различные подходы к генотипированию вируса клещевого энцефалита (ВКЭ): секвенирование участка E-гена длиной 211 пар нуклеотидов (п. н.) с маркерной аминокислотой в 206-й позиции, уникальной для конкретного генотипа; анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; ОТ-ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флюоресцентной детекцией с генотипспецифическими зондами [7, 9]. Исследования с использованием этих методов позволили определить полноразмерные последовательности геномов ВКЭ, установить широкую генетическую вариабельность ВКЭ. Это дало возможность провести ревизию таксономии вирусов, в том числе флавивирусов [20]. Современная генетическая классификация основана на видо-

вых признаках, объективно определенных по степени гомологии гена белка оболочки E с полноразмерным геномом ВКЭ. С учетом различий в геноме выделяют 3 генотипа ВКЭ – дальневосточный (генотип 1), европейский, или западный, (генотип 2) и сибирский (генотип 3) [10, 13, 19]. Данные исследований стали базисом для создания диагностических, лечебно-профилактических препаратов; важным инструментом при организации эпидемиологического надзора за КЭ, в том числе с использованием ГИС-технологий [8, 11, 12]. Эколого-эпидемиологические исследования с учетом генотипов ВКЭ позволили провести картографирование более 30 тыс. природных очагов КЭ в Северном полушарии от Европы до Японии. Каждый из генотипов вируса, как правило, доминирует на определенной территории, где в то же время могут циркулировать штаммы, относящиеся к иным генотипам [2, 4, 10, 14, 16, 17].

Контактная информация:

Виноград Наталия Алексеевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. эпидемиологии; e-mail: vynogradNO@ukr.net

В настоящее время данные о генетических особенностях популяции ВКЭ в Украине ограничены изучением двух штаммов. Штамм Семекс, изолированный в Волынской области, был отнесен к сибирскому генотипу [1], а изолированный в Крыму штамм Crimea – к дальневосточному [13]. Широкий спектр клинической манифестации КЭ на эндемичных территориях позволяет предположить наличие всех генотипов ВКЭ или микстинфицирования [3].

Целью настоящей работы было изучение молекулярной структуры гена белка оболочки Е трех штаммов ВКЭ, изолированных от иксодовых клещей в Крыму в 1989–1990 гг.

Материалы и методы

Штаммы ВКЭ были изолированы путем интрацеребрального заражения новорожденных белых мышей (НБМ) суспензиями пулов иксодовых клещей по стандартной методике [6]. Характеристика изолированных штаммов представлена в табл. 1.

Штаммы поддерживали путем интрацеребрального заражения НБМ и хранили в замороженном виде на уровне 7–9 пассажей.

Выделение тотальной РНК осуществляли с помощью набора реагентов TRIzol® Plus RNA Purification Kit (“Invitrogen”, США). Синтез кДНК проводили со случайными праймерами с помощью набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (“Applied Biosystems”, США). Амплификацию трех перекрывающихся фрагментов гена белка оболочки Е осуществляли в реакционной смеси Platinum PCR Super Mix (“Invitrogen”, США) с оригинальными праймерами (табл. 2). Очищенные на колонках NucleoSpin Extract II (“Macherey-Nagel”, ФРГ) продукты ПЦР амплифицировали в реакционной смеси с терминаторами BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с оригинальными праймерами (см. табл. 2) и перед капиллярным электрофорезом очища-

ли на колонках NucleoSEQ (“Macherey-Nagel”, ФРГ). Исследования на всех этапах выполняли в соответствии с инструкциями производителей реагентов.

Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР определяли на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Выравнивание и сборку консенсусных последовательностей гена белка оболочки Е проводили с помощью программного обеспечения BioEdit version 7.0.5.3 [15]. Филогенетические взаимоотношения изучаемых штаммов с известными геномными последовательностями 34 штаммов ВКЭ – 235 (EF113081.1), Salem (FJ572210.1), AS33 (GQ266392.1), TBE 4387 (X76607.1), 166 (EF113079.1), Ljub. I (AF091012.1), 263 (U27491.1), 282 (EF113087.1), Kem I (AF091011.1), Absettarov (AF091005.1), N256 (AF091014.1), A52 (X60286.1) Scharl (AF091017.1), TG Frauenfeld (HM468157.1), Iso 40 (AF091009.1), T1401 (EU872053.1), Neudoerfl (U27495.1), KrM93 (EU276109.1), ZZ9 (AF091020.1), Als. I (AF091007.1), K23 (AF091010.1), NYPR (X75286.1), T1401 (EU872053.1), Stara Ves (AF091018.1), Toro-2003 (DQ401140.2), Pan (AF091015.1), Zausaev (AF527415.1), Vasilchenko (M97659.2), Semeks (AF224665.1), 886-84 (EF469662.1), 178-79 (EF469661.1), Sofjin (X07755.1), Oshima 5-10 (AB001026.1), Crimea (AF091008.1), вирус шотландского энцефаломиелита овец (ШЭО) (Louping ill virus SB 526 (M94957.1) и омской геморрагической лихорадки (ОГЛ) (OHFV (X66694.1) оценивали с помощью программы Mega 5.0. Последовательности выравнивали с помощью программы Clustal W и затем анализировали методом присоединения соседей (neighbor-joining method – NJ, p-distance). Статистическую оценку филогенетического древа проводили посредством бутстрэп-анализа с созданием 1000 случайных выборок.

Результаты

В результате секвенирования были получены нуклеотидные последовательности гена белка оболочки Е штаммов ВКЭ 80, 85 и 290, изолированных из иксодовых клещей в Крыму в 1989–1990 гг. Анализ нуклеотидных последовательностей показал 100% идентичность гена Е у всех трех изучаемых штаммов. При сравнительном выравнивании полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями ранее изученных штаммов ВКЭ отмечен более высокий уровень идентичности штаммов, выделенных в Крыму, со штаммами европейского генотипа – от 93,95% (штамм TG Frauenfeld) до 97,24% (штамм Pan) – при варьировании совпадения нуклеотидных последовательностей с сибирским и дальневосточным генотипа-

Таблица 1

Характеристика изолированных в Крыму штаммов ВКЭ

Штамм	Вид, количество и фаза развития клещей, способ сбора	Место и дата сбора
80	<i>Ixodes ricinus</i> , 27 имаго, на флаг	Симферопольский район, с. Красное, 07.04.89
85	<i>Ixodes ricinus</i> , 34 имаго + 205 нимф, на флаг	Бахчисарайский район, буковый лес, 18.04.89
290	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> , 100 имаго, на флаг	Белогорский район, с. Горлинка, 29.05.90

Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры для амплификации и секвенирования фрагментов гена белка оболочки Е ВКЭ

Праймер	Направление праймера	Последовательность праймера (5'–3')	Позиция праймера в геноме ВКЭ*	Размер ампликона, п. н.
904F1	Прямое	ACC CTG GAG AGT GTG GTG AC	904–923	633
1536R1	Обратное	GAC CCT GCA CAA CAA AGA CA	1517–1536	
1361F2	Прямое	ATG TGT ACG ACG CCA ACA AA	1361–1380	
1986R2	Обратное	ACA GGG CTT TGT TCC AGA GA	1867–1986	626
1847F3	Прямое	TGG GAC TGG AAA AAC TGA AGA	1847–1867	
2534R3	Обратное	ACC TCT CTC CAC ACG ACC AG	2515–2534	

Примечание. * – позиция в полногеномной последовательности ВКЭ (GenBank: NC_001672.1).

ми от 84,81% (штамм Crimea) до 85,67% (штамм 886-84). Принадлежность штаммов 80, 85 и 290 к европейскому генотипу была также подтверждена данными филогенетического анализа (см. рисунок) и наличием сигнатурных аминокислот 47(A), 88(G), 115(A), 178(E), 206(V), 267(A), 277(E), 317(A), 426(A), 431(S), 433(I) и 437(V), характерных для штаммов европейского генотипа ВКЭ [13].

Выравнивание и анализ аминокислотных последовательностей белка оболочки E позволили выявить две уникальные для штаммов 80, 85 и 290 аминокислотные замены: аспарагин (N) в позиции 67 и аргинин (R) в позиции 266. Также были обнаружены две редко встречающиеся у штаммов европейского генотипа аминокислотные замены: валин (V) в позиции 306 и аргинин (R) в позиции 407.

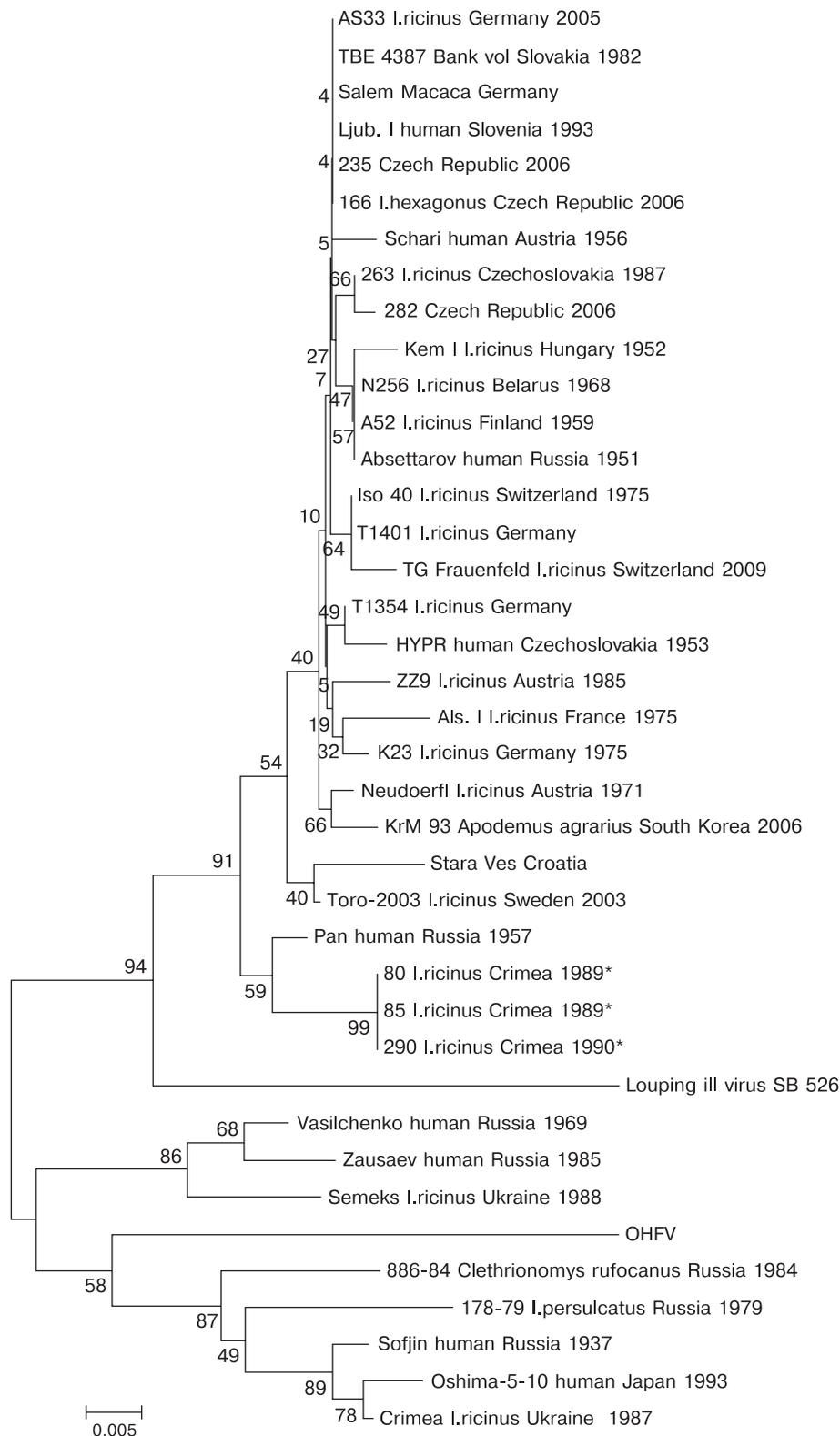
Обсуждение

Существование природных очагов КЭ в Крыму известно с середины 50-х годов прошлого века. В последние годы заболеваемость КЭ на полуострове носит спорадический характер и, согласно данным официальной статистики, составляет 0,05–1,5 на 100 тыс. населения. В 2009 г. в Крыму было зарегистрировано 9 случаев КЭ (0,02 на 100 тыс. населения). Заболевания клинически манифестируют преимущественно в виде лихорадки, реже в форме менингита или энцефалита. Основным переносчиком ВКЭ в Крыму, как и в большинстве других регионов Европы, является иксодовый клещ *Ixodes ricinus*, обитающий в горно-лесной части полуострова.

Изучение молекулярно-генетических особенностей крымской популяции ВКЭ, несомненно, имеет как научное, так и прикладное значение. В результате проведенного нами секвенирования и сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена белка оболочки E штаммов ВКЭ 80, 85 и 290 была установлена 100% идентичность данного фрагмента генома у всех трех изучаемых штаммов. Изоляция ВКЭ из клещей разных видов (*I. ricinus* и *H. marginatum marginatum*), собранных в трех граничащих друг с другом административных районах (Бахчисарайский, Симферопольский и Белогорский), территории которых включают горно-лесную часть полуострова на северном склоне Главной гряды Крымских

гор, может свидетельствовать о существовании стойкого природного очага генетически однородной популяции вируса.

На основе филогенетического анализа с ранее охарактеризованными штаммами ВКЭ штаммы 80, 85 и 290 были отнесены к европейскому (западному) генотипу.



Филогенетическое древо (NJ, p-distance), иллюстрирующее генетическое родство 34 прототипных штаммов и крымских изолятов ВКЭ (штаммы 80, 85 и 290).

Вирусы шотландского энцефаломиелита овец (*Louping ill virus*) и омской геморрагической лихорадки (ОНФV) использованы в качестве внешней группы. Шкала показывает количество нуклеотидных замен на 1 сайт. Штаммы, секвенированные в данной работе, обозначены звездочкой.

типу вируса. Обращает на себя внимание тот факт, что крымские штаммы оказались наиболее родственны штамму Pan, занимающему обособленное филогенетическое положение среди штаммов ВКЭ с расшифрованным геномом [13]. Анализ аминокислотных последовательностей показал наличие 4 аминокислотных замен – 67(N), 266(R), 306(V) и 407(R) – в доменах II и III эктодомена и трансмембранном сегменте. Уникальные аминокислоты 67(N) и 266(R) расположены в домене II (аминокислотные остатки 52–136 и 190–284), выступающем над поверхностью вириона и предположительно участвующем в слиянии с клеточной мембраной. У остальных анализируемых штаммов независимо от генотипа в 67-й позиции находилась аспарагиновая кислота (D), а в 266-й позиции – лизин (K).

Аминокислотная замена 306(V), отличающая штаммы 80, 85 и 290 от большинства анализируемых штаммов ВКЭ, расположена в домене III (аминокислотные остатки 303–395), который предположительно считается участком связывания с клеточным рецептором [18]. Валин (V) в позиции 306 также обнаружен у штаммов Pan и ZZ9 европейского генотипа, штаммов сибирского генотипа и двух из четырех штаммов дальневосточного генотипа (Oshima 5-10 и 178-79) [13]. У остальных анализируемых штаммов в 306-й позиции находился метионин (M).

В трансмембранном сегменте за пределами эктодомена (аминокислотные остатки 1–395) у штаммов 80, 85 и 290 обнаружена аминокислотная замена 407(R), характерная для штаммов сибирского и дальневосточного генотипов, но редко встречающаяся у штаммов европейского генотипа, у которых, за исключением штаммов Pan и Stara Ves, в 407-й позиции находится лизин (K). Аналогичная аминокислотная замена также присутствует у относящегося к дальневосточному генотипу штамма Crimea, выделенного из клещей *I. ricinus* в Крыму в 1987 г. [13].

Происхождение штамма Crimea, близкородственно японскому штамму Oshima 5-10 [13], требует более глубокого изучения. Можно предположить, что предок штамма Crimea мог быть завезен в Крым в 1957 г. с отловленными в Приморском крае дикими кабаном [5].

Следствием присутствия в Крыму 2 генотипов ВКЭ (европейского и дальневосточного) может быть разнообразие клинических проявлений заболевания у людей от легких лихорадочных форм до тяжелых осложненных энцефалитов с высокой летальностью.

Таким образом, нами впервые было показано существование в Крыму европейского генотипа ВКЭ. Анализ первичной структуры гена белка E штаммов ВКЭ 80, 85 и 290 свидетельствует о гомогенности штаммов европейского генотипа. Вместе с тем обнаружение в Крыму 2 генотипов вируса указывает на широкую генетическую вариабельность популяции ВКЭ на полуострове, что необходимо учитывать при диагностике КЭ, проведении профилактических и противоэпидемических мероприятий в регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адельшин Р. В., Злобин В. И., Беликов С. И. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах Балтии, Восточной и Юго-Восточной Европы // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2006. – № 2. – С. 27–34.
2. Верховина М. М., Злобин В. И., Козлова И. В. и др. Эколого-эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита на территории Иркутской области // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2008. – № 1. – С. 12–18.
3. Виноград Н. А., Василишин З. П. Клинико-эпидемиологические особенности вирусного клещевого энцефалита на современном этапе // Сучасні інфекції. – 2010. – № 3. – С. 8–11.
4. Вотяков В. И., Злобин В. И., Мишаева Н. П. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции). – Новосибирск: Наука, 2002.
5. Гольдин Е. Б. Паразитофауна дикого кабана *Sus scrofa* Linnaeus, 1758: биоразнообразие и состояние изученности // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 19. – С. 76–89.
6. Громашевский В. Л. Методы изоляции арбовирусов // Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований). – М., 1986. – С. 90–93.
7. Демина Т. В., Джисоев Ю. П., Верховина М. М. и др. Исследование генетической вариабельности и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопр. вирусол. – 2009. – № 3. – С. 33–42.
8. Злобин В. И., Верховина М. М., Демина Т. В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. – 2007. – № 6. – С. 4–13.
9. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г. и др. Применение молекулярно-генетических методик для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюл. СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 34–40.
10. Локтев В. Б., Терновой В. А., Нетесов С. В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. – 2007. – № 5. – С. 10–16.
11. Погодина В. В., Карань Л. С., Колясников Н. М. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусол. – 2007. – № 5. – С. 16–21.
12. Шучинова Л. Д. Эпидемиологический надзор и контроль инфекций, передающихся клещами, в Республике Алтай: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Омск, 2009.
13. Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P. 179–185.
14. Gratz N. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение. – Европейское региональное бюро ВОЗ, 2005.
15. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Ser. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
16. Jääskeläinen A. E., Tikkaoski T., Uzcátegui N. Y. et al. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12, N 10. – P. 1568–1571.
17. Lundkvist K., Vene S., Golovljova I. et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes // J. Med. Virol. – 2001. – Vol. 65, N 4. – P. 730–735.
18. Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // Nature. – 1995. – Vol. 375. – P. 291–298.
19. Ruzek D., Stastna H., Kopecky J. et al. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR // J. Virol. Meth. – 2007. – Vol. 144, N 1–2. – P. 133–137.
20. Thiel H. J., Collett M. S., Gould E. A. et al. / Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A., Eds. Virus taxonomy: Classification and nomenclature: Eighth report of the International committee on the taxonomy of viruses / Eds C. M. Fauquet et al. – New York; Oxford: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 981–998.

Поступила 26.05.11