

---

## ДИСКУССИЯ

---

© КОВАЛЕВ С.Ю., МУХАЧЕВА Т.А., 2016  
УДК 616.831-002-022:578.833.26]:577.21.083

*Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А.*

### УНИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург

---

Применение молекулярно-генетических методов и подходов в эпидемиологических исследованиях стало настоящим прорывом в понимании закономерностей, путей и механизмов распространения возбудителей инфекций. Однако отсутствие стандартных методов исследования приводит к несопоставимости форматов полученных результатов. В целях унификации методов предлагается выбрать один фрагмент вирусного генома, секвенирование которого было бы необходимым и достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита (КЭ). Кандидатом на эту роль может быть фрагмент гена *E* длиной 454 нуклеотидов, представленный наибольшим количеством последовательностей в базе данных GenBank. Кроме того, на основе кодируемой этим фрагментом аминокислотной последовательности была разработана система дифференциации вируса КЭ (ВКЭ) на структурные единицы – кластероны (Kovalev S., Mukhacheva T., 2013). На примере природных очагов Среднего Урала была показана информативность кластеронного подхода к изучению генетической структуры популяции ВКЭ-Сиб. Каждый очаг КЭ оказался уникальным как по количественному, так и по качественному составу кластеронов. При этом наибольшее их разнообразие наблюдалось на юге Среднего Урала в зоне Транссибирского пути, что отражает историю колонизации этой территории, тесным образом связанную с дорогами из Сибири в европейскую часть России. Было выявлено три кластерона возрастом не более 50 лет, присутствие которых может свидетельствовать об активном эволюционном процессе в популяциях ВКЭ-Сиб. В свою очередь тип их территориального распределения указывает на решающую роль антропогенного фактора в распространении ВКЭ (Kovalev S., Mukhacheva T., 2014). Кластеронный подход позволяет учесть не только генетическую, но и фенотипическую изменчивость вируса и должен рассматриваться скорее в качестве дополнения, а не альтернативы филогенетическому анализу. Помимо научного, предлагаемый подход может иметь и прикладное значение, например использоваться региональными службами Роспотребнадзора для эпидемиологического мониторинга КЭ. Унификация исследований на основе одного стандартного генетического маркера позволит объединить усилия исследователей из разных регионов России и других стран в изучении КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; унификация; фрагмент генома; генетическая структура; кластерон.

*Для цитирования:* Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А. Унификация молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (2):89-95.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-89-95

*Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A.*

#### UNIFICATION OF THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, 620000, Russian Federation

Molecular genetic techniques and approaches in epidemiological studies were breakthrough in the understanding of the laws, ways, and mechanisms of the spread of the pathogens. However, lack of standard methods makes it difficult to compare results obtained by different scientific groups. In this work we propose to choose one fragment of the TBEV genome as a genetic marker whose sequencing would be both obligatory and sufficient for the molecular epidemiological studies. The best candidate for this purpose may be a fragment of the gene *E* of 454 nucleotides in length. The deduced amino acid sequence of this fragment was a basis for a new approach for the TBEV differentiation with clusteron being a structural unit (Kovalev and Mukhacheva, 2013). The clusteron approach was proved to be informative for studying the genetic structure of the TBEV-Sib population in the Middle Urals. TBE foci were shown to be unique in both quantitative and qualitative composition of the clusterons. The greatest clusteron diversity in the south of the Middle Urals, through the Trans-Siberian way, may reflect the history of the colonization, closely associated with the roads between Siberia and the European part of Russia. The age of three clusterons did not exceed 50 years, which may indicate an ongoing evolutionary process taking place in the TBEV-Sib populations. In turn, their spatial distribution indicates the crucial role of human factors in the spread of the TBEV (Kovalev & Mukhacheva, 2014). The clusteron approach provides formalization of ideas about the structure of the viral populations and could be used not only by researchers but also by epidemiological surveillance services. Unification of the studies of the TBEV on the basis of a standard genetic marker would consolidate the efforts of researchers from different regions of Russia and other countries.

---

*Для корреспонденции:* Ковалев Сергей Юрьевич, канд. биол. наук, доцент, зав. лаборатории молекулярной генетики ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург, E-mail: sergey.kovalev@urfu.ru

**Key words:** tick-borne encephalitis virus; unification; genome fragment; genetic structure; clusteron.

**For citation:** Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Unification of the molecular epidemiological research of the tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 89-95. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-89-95

**For correspondence:** Sergei Y. Kovalev, Candidate of Biology, Associate Professor, Head of Laboratory of Molecular Genetics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, 620000, Russian Federation, E-mail: sergey.kovalev@urfu.ru

**Information about authors:**

Kovalev S.Y., orcid.org/0000-0002-4669-5288

Mukhacheva T.A., orcid.org/0000-0002-9300-5921

**Acknowledgments.** The authors are grateful to B.A. Galishev, V.L. Umpelev, T.A. Pimenova, and T.E. Snitkovskaya for help in collecting ticks and organizing expeditions.

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 16-04-00329 A).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 02 September 2014

Accepted 25 September 2014

## Для чего нужна унификация молекулярно-эпидемиологических исследований?

Унификацией (лат. unus – один + facio – делаю; объединение) называется приведение к единообразию, единой форме или системе.

Привлечение молекулярно-генетических методов и подходов к эпидемиологическим исследованиям стало прорывом в понимании закономерностей, путей и механизмов распространения возбудителей инфекций человека, животных и растений. В результате сформировалось новое научное направление – молекулярная эпидемиология [1]. На этапе накопления первичных данных были приемлемы любые методы, в частности рестрикционный анализ, олигонуклеотидное картирование, молекулярная гибридизация, секвенирование и другие. Однако со временем несовместимость форматов получаемых данных стала важным препятствием в решении вопросов эволюции возбудителя, установлении его генетической структуры, проведении мониторинга природных очагов и т. д.

Сегодня в молекулярной эпидемиологии клещевого энцефалита (КЭ) применяются два несопоставимых метода: молекулярная гибридизация и секвенирование нуклеиновых кислот. Первый метод ввиду его ограниченной применимости и низкой информативности сейчас используется крайне редко, в то время как секвенирование стало основой молекулярно-эпидемиологических исследований КЭ. Определение полной нуклеотидной последовательности вирусного генома было бы идеальным решением и навсегда решило проблему несовместимости форматов. Однако, несмотря на небольшие размеры (около 11 тыс. нуклеотидов), количество полногеномных последовательностей вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) равняется лишь 73 (без учета 24 последовательностей, кодирующих полипротеин), а темп их поступления в базу данных GenBank составляет всего несколько последовательностей в год. Проблема заключается в том, что для полногеномного секвенирования требуется значительное количество генетического материала, которое чаще всего можно получить только из штаммов, хранящихся лишь в нескольких вирусологических коллекциях. Кроме того, было отмечено, что в результате длительного пассирования штаммов ВКЭ на лабораторных животных или культуре клеток нуклеотидная последовательность вирусного генома может отличаться от исходной [2, 3]. Поэтому большинство исследователей сосредоточилось на секвенировании

фрагментов вирусного генома (генетические маркеры) различной длины в зависимости от своих предпочтений и возможностей.

Наиболее часто в научной литературе фигурируют такие важные маркеры, как ген *E* и/или его фрагменты, 5'- и 3'-нетранслируемые регионы (НТР), а также гены *NS5* и *NS3* (рис. 1). Такое разнообразие маркеров неизбежно приводит к трудностям в установлении филогенетических связей между разными штаммами. Единственный выход из сложившейся ситуации мы видим в унификации, т. е. в устранении излишнего количества подходов и приведении их к единообразию. Иными словами, было бы рационально выбрать один генетический маркер (стандартную последовательность) вирусного генома, секвенирование которого было бы необходимым и достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований. В отдельных случаях для исследования предпочтительнее брать два и более фрагмента вирусного генома. Как правило, это требование относится к вирусам, обладающим выраженной способностью к рекомбинации (Picorna-, Retroviridae и др.) или имеющим сегментированный геном (Reo-, Orthomyxo-, Bunyaviridae и др.). Однако поскольку ВКЭ является вирусом с несегментированным геномом, для которого наличие рекомбинации не было показано экспериментально, изучение одного генетического маркера является достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований. Исследования, безусловно, не должны ограничиваться только этим участком, однако определение его последовательности должно стать обязательным. Это позволило бы объединить результаты работы исследовательских групп, работающих в разных регионах РФ и других странах, в единое информационное пространство для изучения КЭ в глобальном масштабе на всем ареале вируса от Дальнего Востока до Западной Европы. Следует отметить, что унифицированная процедура мультилокусного сиквенс-типирования хорошо зарекомендовала себя в области молекулярной эпидемиологии бактериальных инфекций и пользуется все большей популярностью среди исследователей [4, 5].

В качестве стандартного маркера мы предлагаем фрагмент гена *E* длиной 454 нуклеотида [6] (в качестве примера – последовательность под номером доступа в GenBank GU444161). В настоящее время в базе данных GenBank насчитывается 1164 последовательности, содержащие этот фрагмент, что в несколько раз больше по сравнению с остальными маркерами (см. рис. 1). Бо-

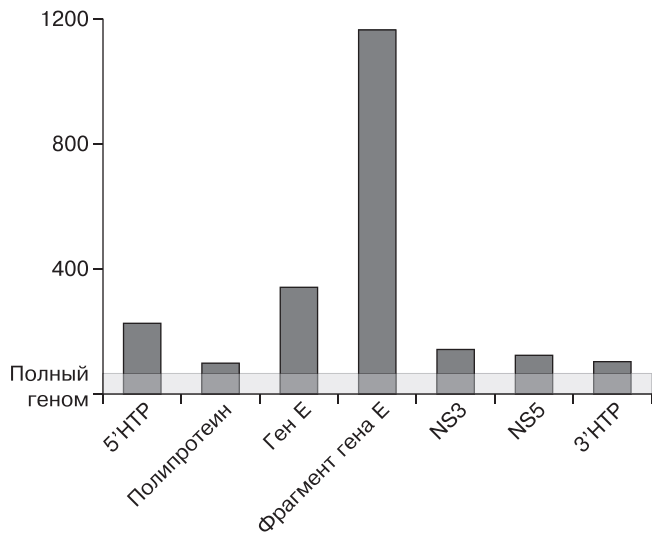


Рис. 1. Представленность последовательностей наиболее часто используемых генетических маркеров ВКЭ в базе данных GenBank. Светло-серым цветом показано количество полногеномных последовательностей на фоне числа последовательностей для каждого маркера (темно-серый цвет). Фрагмент гена E – предлагаемый для унификации исследований участок длиной 454 нуклеотида.

лее того, на основе анализа этого фрагмента нами была предложена система дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа, основанная на объединении их в кластероны, т. е. группы штаммов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность фрагмента белка E [6]. Использование кластеронного подхода в качестве инструмента для изучения и мониторинга генетической структуры популяций вируса в природных очагах КЭ на региональном и локальном уровне показало его высокую информативность [7].

Целью настоящей статьи является теоретическое обоснование необходимости внедрения в практику молекулярно-эпидемиологических исследований унифицированного подхода, основанного на установлении кластеронной структуры ВКЭ в природных очагах, для создания целостного представления о генетическом разнообразии вирусных популяций и разработки принципов перманентного мониторинга очагов КЭ.

### Кластероны и кластеронная структура

В 2009 г. нами была показана принципиальная возможность объединения штаммов и изолятов ВКЭ-Сиб (далее природные изоляты вирусов и штаммы будут обозначаться как штаммы) в отдельные группы или кластеры по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента поверхностного белка E [8].

Одним из важнейших является вопрос о критериях выбора фрагмента вирусного генома и его размера. Гликопротеин E является основным структурным мембранным белком ВКЭ, который обеспечивает связывание ВКЭ с клеточными рецепторами, определяет тропизм,

вирулентность и обеспечивает образование вируснейтрализующих антител [9]. Как было показано ранее, нуклеотидная последовательность этого участка генома является информативным маркером для определения филогенетических связей как между вирусами комплекса КЭ, так и между субтипами в пределах одного вида вируса [10–14]. Этот район генома относительно консервативен, однако его размер и уровень вариабельности достаточны для калибровки молекулярных часов и расчета эволюционного возраста ВКЭ [11, 15–17]. Фрагмент гена E длиной 454 нуклеотидов (позиции с 311 по 762 гена E без участков связывания праймеров) и кодируемый им фрагмент гликопротеина E (104–254 аминокислотных остатков) был выбран нами по ряду причин. Во-первых, он содержит как консервативные, так и вариабельные участки [12]. В него входят аминокислотные замены в позициях 206, 175, 234, которые являются специфичными для субтипов ВКЭ и филогенетических линий ВКЭ-Сиб [18–20]. Во-вторых, на момент начала исследований в GenBank уже имелось достаточное количество последовательностей, включавших интересующий нас фрагмент, что позволило провести сравнительный анализ данных. В-третьих, размер данного участка позволяет найти компромисс между достаточной информативностью маркера и возможностью его амплификации непосредственно из зараженного клеща (минуя стадию выделения штамма вируса), что позволяет исследовать максимально возможное количество изолятов ВКЭ и получать важнейшую информацию о возбудителе непосредственно в ходе эпидемического сезона.

Значительное пополнение базы данных GenBank последовательностями вирусного генома и его фрагментов (1164 последовательности на февраль 2014 г.) в последние несколько лет позволило структурировать всю совокупность штаммов ВКЭ на основе общего подхода. В качестве основного элемента структуры был предложен кластерон – группа штаммов ВКЭ (более 3 для ВКЭ-Сиб и более 2 для ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев), имеющих идентичную аминокислотную последовательность, филогеографически связанных между собой и обладающих определенным типом территориального распределения: локальным или коридорным [6]. Название кластерона состоит из буквенно-цифрового индекса: цифра обозначает субтип (1 – ВКЭ-Дв, 2 – ВКЭ-Ев и 3 – ВКЭ-Сиб), а буква – определенную аминокислотную последовательность. Штаммы с уникальной последовательностью, встретившиеся 1 или 2 раза, были отнесены к группе уникальных (см. таблицу). Для расчета времени дивергенции штаммов внутри кластерона использовалась прямая оценка скорости нуклеотидных замен  $1,56 \pm 0,29 \cdot 10^{-4}$  синоними-

Сравнение характеристик кластеронов трех субтипов ВКЭ

Субтип ВКЭ	Количество штаммов	Количество кластеронов	Минимальное количество штаммов в кластероне	Количество штаммов в кластеронах, %	Количество уникальных штаммов, %	Количество всех вариабельных позиций, %	Количество вариабельных позиций в кластеронах
ВКЭ-Сиб	762	18	3	623 (81,8)	139 (18,2)	70 (46,4)	13
ВКЭ-Ев	265	10	2*	227 (85,7)	38 (14,3)	28 (18,5)	9
ВКЭ-Дв	137	11	2*	114 (83,2)	23 (16,8)	31 (20,5)	10
Всего...	1164	39	-	964 (82,8)	200 (17,2)	-	-

Примечание. \* – ввиду меньшего числа штаммов дальневосточного (ВКЭ-Дв) и европейского (ВКЭ-Ев) субтипов минимальное количество штаммов в кластероне было уменьшено до двух.

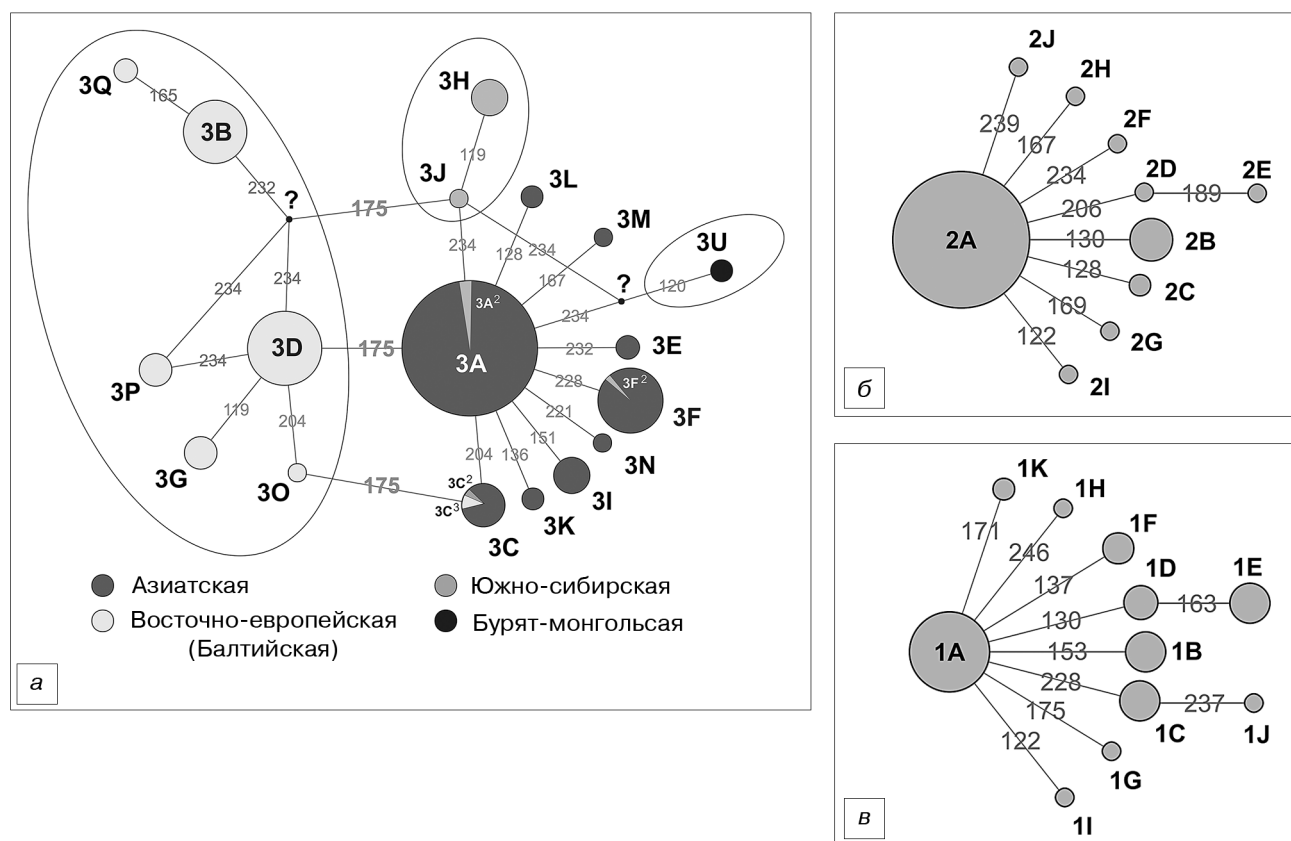


Рис. 2. Филогенетические сети кластеронов ВКЭ-Сиб (*a*), ВКЭ-Ев (*б*), ВКЭ-Дв (*в*). Кластероны всех субтипов имеют буквенное обозначение с номером субтипа. Так, кластероны 1А, 2А и 3А будут относиться к ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно. Овалами выделены филогенетические группы кластеронов. Площадь кругов пропорциональна количеству штаммов в кластере. Знаком вопроса обозначены последовательности, предсказанные теоретически, но пока не обнаруженные у вирусных изолятов. На линиях, соединяющих кластероны, обозначены позиции аминокислотных замен в белке Е.

ческих замен в год [8]. Сравнительные характеристики кластеронов трех субтипов ВКЭ показаны в таблице.

Наиболее удобным способом графического представления кластеронной структуры субтипов ВКЭ являются филогенетические сети, отражающие различия последовательностей в одну аминокислотную замену (рис. 2) [21]. Кластеронная структура ВКЭ-Сиб является наиболее сложной и представлена разветвленной сетью кластеронов с разным количеством штаммов (см. рис. 2, *a*). Различия между кластеронами внутри ВКЭ-Сиб могут достигать до 6 аминокислотных замен. В то же время кластеронная структура ВКЭ-Ев и ВКЭ-Дв достаточно проста, максимальные различия между кластеронами внутри субтипа составляют 3 и 4 аминокислотные замены соответственно (см. рис. 2, *б, в*).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей [6] позволил выделить внутри ВКЭ-Сиб 4 монофилетические группы (см. рис. 2). Кластероны ВКЭ-Сиб первой филогенетической группы (3А, 3С, 3Е, 3F, 3I, 3К, 3L, 3М и 3N) составляют большую часть изученных штаммов и 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, распространенная на Урале,

в северо-западной части России, а также в странах Балтии (3В, 3D, 3G, 3O, 3P и 3Q), была названа *Восточно-европейской*, или *Балтийской* (Est54, DQ393773). Четвертая группа (кластерон 3U, штамм 886–84) встречается в Бурятии и Северной Монголии и была названа *Бурят-монгольской* (886–84, EF469662) (см. рис. 2). Все штаммы ВКЭ-Сиб, входящие в кластероны одной филогенетической группы, связаны между собой общим происхождением.

Среди последовательностей фрагмента белка Е штаммов ВКЭ-Сиб 70 из 151 аминокислоты оказались вариabельными, однако кластероны были выделены на основании только 13 аминокислотных замен (остальные встречались только у уникальных штаммов) (см. таблицу). Позиции кластеронспецифичных аминокислотных замен, как правило, различаются между субтипами. По всей видимости, аминокислотный профиль (уникальная комбинация аминокислотных замен) каждого кластерона не является случайным, поскольку закреплен у большого количества штаммов, эволюционно и географически связанных между собой. Было показано, что кластеронспецифичные аминокислотные замены у штаммов ВКЭ-Сиб расположены только на одной латеральной поверхности гликопротеина Е [6]. Это может свидетельствовать о некой функциональной роли этих замен, изучение которой является отдельным вопросом и требует дальнейших исследований.





Рис. 3. Кластерное разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала. Градациями серого цвета обозначены территории с разным количеством кластеронов (от 1 до 9).

Количественный и качественный состав кластеронов, время появления и их филогенетические связи определяют кластеронную структуру ВКЭ.

Можно предположить, что любая территория, эндемичная по КЭ, представляет собой уникальный набор кластеронов с разным количеством штаммов в кластере, а также типами их распределения. В связи с этим представляется логичным применить кластеронный подход в качестве инструмента для изучения генетической структуры популяций вируса и мониторинга природных очагов КЭ.

**Применение кластеронного подхода для изучения природных очагов**

Кластеронный подход был применен для популяции ВКЭ из природных очагов Среднего Урала (в основном Свердловской области). Выбор территории обусловлен рядом причин. Во-первых, на территории Урала регистрируется высокий уровень заболеваемости – 20% всей заболеваемости в России с ежегодной регистрацией летальных случаев [22]. Во-вторых, наблюдение за штаммами ВКЭ на этой территории ведется на протяжении почти 50 лет (с 1966 г.). В-третьих, около 1/3 всех нуклеотидных последовательностей ВКЭ, представленных в GenBank, принадлежат штаммам и изолятам, выделенным на этой территории.

Начиная с 1966 г. на территории Свердловской области было выделено 387 изолятов и штаммов ВКЭ-Сиб. Из них 321 (82,9%) был дифференцирован на кластероны, остальные были отнесены к уникальным. Из 18 известных к настоящему времени кластеронов этого субтипа на Среднем Урале выявлено 14. Уральские штаммы ВКЭ-Сиб представлены в основном Азиатской (более 80%) и

в меньшей степени Восточно-европейской (около 20%) группами кластеронов [7]. На территории Свердловской области встречаются кластероны, характерные как для Западной Сибири, так и северо-запада европейской части России.

Разнообразие кластеронов ВКЭ и их распределение по территории являются двумя наиболее существенными

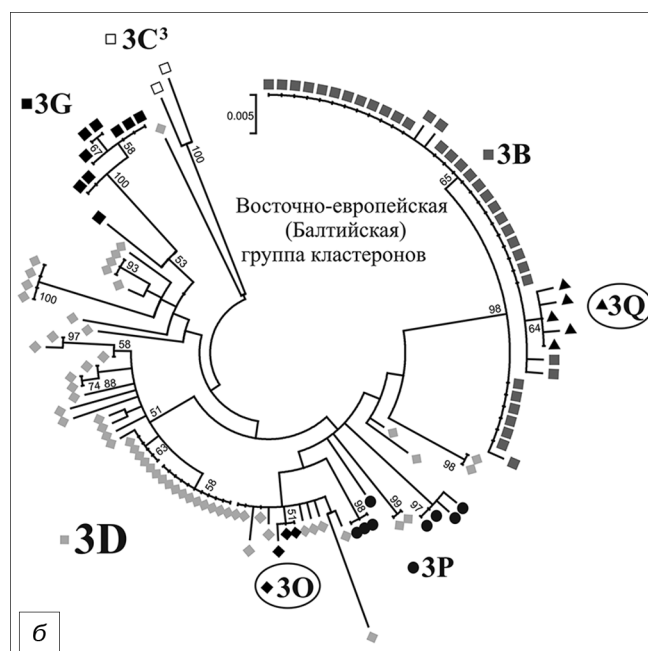


Рис. 4. Карта распределения кластеронов 3I, 3O и 3Q по территории Свердловской области (а); дендрограмма, демонстрирующая клональное происхождение кластеронов 3O и 3Q Восточно-европейской филогенетической линии (б). Филогенетическое положение штаммов кластера 3I Азиатской филогенетической линии не приведено.

характеристиками популяций ВКЭ в природном очаге. Было показано, что в Свердловской области количество кластеронов изменяется в широтном направлении. Так, наибольшее разнообразие (9 кластеронов) приходится на Екатеринбург и его пригороды, а также южную часть Свердловской области вдоль трассы Екатеринбург – Тюмень (рис. 3). По мере продвижения на север кластеронное разнообразие штаммов ВКЭ существенно снижается. Так, в пригородах Нижнего Тагила – второго по величине города Свердловской области – встретилось только 5 кластеронов, а в Верхотурском и Серовском районах (север области) – лишь по 2 (см. рис. 3). На остальной малонаселенной территории области встречается, как правило, только 1 кластерон 3А [7]. Значительное разнообразие кластеронов на юге области в зоне Транссибирского пути согласуется с ранее предложенной гипотезой о распространении ВКЭ-Сиб из Западной Сибири в результате колонизации европейцами этой территории в начале XVII века [8].

Большинство кластеронов не являются уникальными для Среднего Урала. Однако 3 кластера – 3I (Азиатская группа кластеронов), 3O и 3Q (Восточно-европейская группа) – встречаются только на этой территории и представляют особый интерес. Филогенетический анализ показал, что эти кластероны характеризуются клональным происхождением и низким генетическим разнообразием штаммов, что дает основание предполагать их недавнее происхождение (рис. 4, б). Кластерон 3Q (5 штаммов) имеет коридорный тип распределения с юга на север и встречается вдоль трассы Екатеринбург – Серов (см. рис. 3, а). По всей видимости, он является производным кластера 3B (см. рис. 4, б), от которого отличается одной аминокислотной заменой (Ser вместо Phe в позиции 165 белка E). Возраст кластера 3Q составил около 28 (24–37) лет. Кластерон O (3 штамма) имеет локальный тип распределения (окрестности г. Камышлов) и происходит от кластера 3D (см. рис. 4, а, б). Возраст этого кластера составляет всего 14 (12–17) лет. Локальный тип распределения характерен и для кластера 3I (пригород г. Березовский). Его возраст составил 42 (36–52) года.

Присутствие “молодых” кластеронов в природных очагах может свидетельствовать об активном эволюционном процессе, происходящем в популяциях ВКЭ в настоящее время. Филогенетическая близость штаммов в этих кластерах не оставляет сомнений в их клональном происхождении (см. рис. 4, б). Для «молодых» кластеронов естественно предположить локальный тип распределения, что и подтверждается на примере кластеронов 3O и 3I. Однако для кластера 3Q был отмечен коридорный тип (см. рис. 4, а). Штаммы этого кластера обнаружены исключительно вдоль трассы Екатеринбург – Серов протяженностью около 340 км, а также в окрестностях Екатеринбурга. На преодоление этого расстояния, если исходить из возраста кластера, должно было уйти не более 30 лет. Причины высокой скорости распространения штаммов этого кластера, а также близость к транспортным путям дают возможность предположить, что в основе распространения кластера 3Q лежит хозяйственная деятельность человека. При этом такая деятельность должна быть масштабной и действовать в течение времени, достаточного для переноса штаммов на большое расстояние. После тщательного сопоставления времени проводимых на интересующем нас участке долгосрочных масштабных мероприятий мы пришли к выводу, что распространение штаммов данного

кластера могло произойти в результате строительства автомобильной трассы Екатеринбург – Серов. Строительство велось 11 лет (с 1975 по 1985 г.) преимущественно в одном направлении (от Екатеринбурга). Домашние животные, синантропные виды зверей и птиц, сопровождавшие бригады дорожных строителей на протяжении всего времени строительства, вероятно, были основной причиной распространения зараженных вирусом клещей на большие расстояния за относительно короткое время. Примечательно, что кластерон 3I, распространенный в Березовском районе (окрестности Екатеринбурга), сохранил локальный тип распределения, несмотря на свое более раннее происхождение. На этом примере видно, что 2 кластера, территориально близко расположенные друг к другу, имеют разную судьбу, определяемую влиянием человека. Обладают ли “молодые” кластероны селективным преимуществом, внесут ли они изменения в структуру популяции ВКЭ-Сиб или исчезнут, покажут дальнейшие исследования.

Таким образом, процессы распространения ВКЭ, связанные с антропогенным фактором, могут проходить и в настоящее время, что необходимо учитывать при проведении мероприятий по неспецифической профилактике КЭ, а также разработке новых принципов мониторинга природных очагов.

Необходимо отметить, что кластеронный подход имеет некоторые ограничения и может рассматриваться скорее в качестве дополнения, а не альтернативы филогенетическому анализу. В отличие от последнего он позволяет учесть не только генетическую, но и фенотипическую изменчивость вируса, проявляющуюся в возникновении адаптивных замен аминокислот белка E у кластеронов – групп штаммов с одинаковым фенотипом. Значение таких адаптаций в эволюции ВКЭ еще предстоит выяснить. Кластеронный подход, помимо научного, может иметь и прикладное значение, например использоваться региональными службами Роспотребнадзора для проведения эпидемиологического мониторинга КЭ и оценки влияния изменчивости вируса на эффективность средств диагностики, профилактики и лечения.

В настоящей статье мы привели примеры использования определенного фрагмента вирусного генома и отметили его перспективность для унификации молекулярно-эпидемиологических исследований ВКЭ. Мы не беремся утверждать, что предложенный фрагмент генома является наиболее оптимальным вариантом, однако в связи со сложностями полногеномного секвенирования его повсеместное использование позволит объединить усилия исследователей из разных регионов России и других стран в изучении КЭ.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Б.А. Галишеву, В.Л. Умпелеву, Т.А. Пименовой и Т.Э. Снитковской за помощь в сборе клещей и организацию экспедиций.

**Финансирование.** Настоящая работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00329 А.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–19, 21 см. REFERENCES)

20. Карань Л.С., Погодина В.В., Фролова Т.В., Платонов А.Е. Генетические различия восточно-европейской азиатской популяции вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5: 24–7.
22. Шелкова Е.С., Ковтун О.П., Романенко В.В. Клинико-

эпидемиологические особенности клещевого энцефалита в Свердловской области в периоде массовой иммунизации. *Неврологический вестник*. 2007; 39 (1): 75–9.

## REFERENCES

- Schulte P.A., Perera F.P. *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. Orlando, FL: Academic Press. 1993.
- Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T. et al. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J. Virol.* 2001; 75 (12): 5627–37.
- Romanova L., Gmyl A.P., Dzhivanian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V. et al. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362 (1): 75–84.
- Chan M.S., Maiden M.C., Spratt B.G. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*. 2001; 17 (11): 1077–83.
- Perez-Losada M., Browne E.B., Madsen A., Wirth T., Viscidi R.P., Crandall K.A. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect. Genet. Evol.* 2006; 6 (2): 97–112.
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Clusteron structure of tick-borne encephalitis virus populations. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14:22–8.
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Clusterons as a Tool for Monitoring Populations of Tick-Borne Encephalitis Virus. *J. Med. Virol.* 2014; 86 (2):283–9.
- Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (Pt. 12): 2884–92.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 141–75.
- Zanotto P.M., Gao G.F., Gritsun T., Marin M.S., Jiang W.R., Venugopal K. et al. An arbovirus cline across the northern hemisphere. *Virology*. 1995; 210 (1): 152–9.
- McGuire K., Holmes E.C., Gao G.F., Reid H.W., Gould E.A. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (Pt. 5): 981–8.
- Gao G.F., Hussain M.H., Reid H.W., Gould E.A. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res.* 1993; 30 (2): 129–44.
- Mandl C.W., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology*. 1993; 194 (1): 173–84.
- Marin M.S., Zanotto P.M., Gritsun T.S., Gould E.A. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. *Virology*. 1995; 206 (2): 1133–9.
- Suzuki Y. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia. *Genes Genet. Syst.* 2007; 82 (3): 187–95.
- Zanotto P.M., Gould E.A., Gao G.F., Harvey P.H., Holmes E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93 (2): 548–53.
- Weidmann M., Ruzek D., Krivanec K., Zoller G., Essbauer S., Pfeffer M. et al. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (Pt. 8): 1906–16.
- 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; 80 (Pt. 1): 179–85.
- Golovljova I., Katargina O., Geller J., Tallo T., Mittzenkov V., Vene S. et al. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008; 298 (S. 1): 108–20.
- Karan' L.S., Pogodina V.V., Frolova T.V., Platonov A.E. Genetic diversity of East European and Asian strains of tick-borne encephalitis virus belonging to Siberian genotype. *Bull. sib. med.* 2006; (5): 24–7. (in Russian)
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 1999; 16 (1): 37–48.
- Shelkova E.S., Kovtun O.P., Romanenko V.V. Clinico-epidemiologic peculiarities of tick-borne encephalitis in the Sverdlovsk region during mass immunization. *Neurologicheskiy vestnik*. 2007; 39 (1): 75–9. (in Russian)

Поступила 02.09.14

Принята в печать 25.09.14