

12. Fel'dblyum I.V., Zverev S.Ya., Ostapovich A.V., Alikina Yu.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V. et al. The molecular epidemiological aspects of HIV-infection spreading in Perm region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; (2): 18—24. (in Russian)
13. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N. et al. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(5): 26—32. (in Russian)
14. Delwart E., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., R@tbsamen-Waigmann H. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay analysis of HIV—1 env genes. *Science*. 1993; 262(5137): 1257—61.
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725—9.
16. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772.
17. Yang W., Bielawski J.P., Yang Z. Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Mol. Evol.* 2003, 57(2): 212—21.
18. Delport W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. 2010; 26(19): 2455—7.
19. Thomson M.M., de Parga E.V., Vinogradova A., Sierra M., Yakovlev A., Rakhmanova A. et al. New insights into the origin of the HIV type 1 subtype A epidemic in former Soviet Union's countries derived from sequence analyses of preepidemically transmitted viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2007; 23(12): 1599—604.
20. Riva C., Romano L., Saladini F., Lai A., Carr J.K., Francisci D. et al. Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008; 24(10): 1319—25.
21. Lemey P., Rambaut A., Pybus O.G. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev*. 2006; 8(3): 125—40.

Поступила 12.10.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.833.26.083.2

Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ И УТОЧНЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОГО ПЕЙЗАЖА

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск

Иркутская область является уникальной территорией, на которой зафиксирована циркуляция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) всех известных в настоящее время субтипов. В последние годы в некоторых областях Российской Федерации описан феномен смены субтипов ВКЭ с замещением дальневосточного субтипа сибирским. В настоящей работе представлены результаты индивидуального исследования 11 522 экземпляров иксодовых клещей и проб мозга 81 мелкого млекопитающего, собранных в природных очагах КЭ на территории Иркутской области с 2006 по 2014 г. Выделено и исследовано вирусологическими методами более 60 штаммов ВКЭ, 68 изолятов типированы по фрагменту гена E (1193 п. н.). Большинство штаммов независимо от субтипа продемонстрировали высокую вирулентность для лабораторных мышей (ЛМ) как при внутримозговом, так и при периферическом пути введения вируса. Все штаммы, выделенные от теплокровных (мелких млекопитающих и человека), обладали высокой степенью вирулентности для ЛМ, но на филогенетическом древе попадали в один кластер с изолятами от клещей, собранных в том же районе. «Клещевые» штаммы разной степени вирулентности также не образовывали отдельных кластеров на древе. Филогенетический анализ показал, что генотипический пейзаж ВКЭ на обследованной территории в настоящее время претерпевает изменения, характеризующиеся абсолютным преобладанием сибирского субтипа (94,1%), представленного двумя группами с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко. Группа штаммов Васильченко распространена на всей обследованной территории, штаммы группы Заусаев изолированы в основном в ближайших пригородах Иркутска. В природных очагах Прибайкалья постоянно циркулирует ВКЭ европейского субтипа (не менее 5% выборки), и его штаммы обладают высокой вирулентностью для беспородных белых мышей. ВКЭ дальневосточного субтипа в группе изолятов 2006—2014 гг. не обнаружен. Филогенетическое родство исследованных штаммов больше связано с местом, чем с годом и источником выделения изолята.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; субтипы; штаммы; вирулентность для лабораторных мышей.

Для цитирования: Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229-234.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234

Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I.

TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATES FROM NATURAL FOCI OF THE IRKUTSK REGION: CLARIFICATION OF THE GENOTYPE LANDSCAPE

Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Для корреспонденции: Мельникова Ольга Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. природно-очаговых вирусных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск. E-mail: melnikovaovit@gmail.com

The Irkutsk region is the unique territory where all known subtypes of tick-borne encephalitis virus (TBEV) circulate. In the last years, the phenomenon of changes in TBEV subtypes (substitution of the Far-Eastern subtype by the Siberian one) was noted in some regions of the Russian Federation. The results of individual investigation of 11522 *Ixodes persulcatus* ticks and brain specimens from 81 small mammals collected in natural foci of the Irkutsk region during 2006-2014 are presented in the article. More than 60 TBEV strains have been isolated and studied by virological methods; E gene fragments (1193 b.p.) of 68 isolates have been typed. The majority of the strains (irrespective of subtype) were of high virulence for laboratory mice (LM) in case of both intracerebral and subcutaneous inoculation of virus. All isolates from warm-blooded small mammals and humans were of high virulence for LM, but placed in the same clusters of the phylogenetic tree with ticks collected in the same area. Tick-borne strains of different virulence also did not form separate clusters on the tree. Phylogenetic analysis showed that modern TBEV genotypic landscape of the studied territory is changing toward absolute predominance of the Siberian subtype (94.1%). This subtype is represented by two groups with prototype strains "Zausaev" and "Vasilchenko". The "Vasilchenko" group of strains is spread on the whole territory under study; the strains of "Zausaev" group were isolated previously in the Irkutsk suburbs. The European subtype of TBEV circulates in natural foci of Pribaikalie permanently (at least 5% of the random sampling); the strains are of high virulence for LM. The Far-Eastern TBEV subtype was not found within the group of isolates collected in 2006-2014. The phylogenetic relationship of the strains under study had a higher correlation with the place of isolation than with the year or source.

Key words: tick-borne encephalitis virus (TBEV); subtypes; strains; virulence for laboratory mice.

For citation: Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis virus isolates from natural foci of the Irkutsk region: clarification of the genotype landscape. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 229-234. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234

For correspondence: Olga V. Mel'nikova, Candidate of Biological Sciences, Senior research scientist, Laboratory of natural foci infections, Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: melnikovaovit@gmail.com

Acknowledgments. The authors are grateful to the scientists working in the Laboratory of natural foci infections and the Department of zoology and parasitology of the Irkutsk Antiplague Research Institute, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, S. A. Borisov, T. I. Borisova, D. B. Verzhbutskii, E. A. Vershinin, P. E. Vershinin, M. O. Gorina, G. V. Zimareva, I. M. Morozov, E. T. Petrova, N. N. Piven', A. V. Sevost'yanova, E. A. Sidorova, A. G. Trukhina, A. V. Kholin, S. E. Khudchenko, R. A. Shivarenko, and N. V. Yakovchits, and the scientists of the Sochava Institute of Geography, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, N. E. Krasnoshtanova and S. I. Lesnykh for collection of specimens.

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 29 September 2015

Accepted 19 November 2015

В процессе более чем 75-летнего изучения вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) знания о его природе и свойствах существенно изменяются. В последние годы появляется все больше свидетельств эволюции вируса, проявляющейся расширением нозоареала [1], ростом и изменением структуры заболеваемости на эндемичных территориях [2, 3], регистрацией случаев заболеваний на неэндемичных прежде территориях [1, 4], патоморфозом инфекции [5, 6]. Наконец, в некоторых областях Российской Федерации описан феномен смены субтипов ВКЭ с замещением дальневосточного субтипа сибирским [6—8].

В Прибайкалье с начала 60-х годов XX века стали выделять оригинальные штаммы ВКЭ, отличающиеся как от западного, так и от восточного серотипа [9]. При этом только 2 (Айна/1448, выделенный от больной хронической формой КЭ, и 147 — из мозга полевки) из 21 исследованного штамма, изолированного из разных источников, демонстрировали подобные свойства [10]. В последующие годы В.В. Погодина [11] при изучении большой группы таких штаммов выделила их в отдельный серотип, который назвала среднесибирско-забайкальским или сибирским. В 70-е и 80-е годы прошлого века доля штаммов сибирского серотипа в исследуемых коллекциях штаммов стала возрастать. А.Г. Трухина [12] из 81 штамма ВКЭ, выделенного в природных очагах Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия), к серотипу Айна/1448 отнесла 41 штамм, к восточному — 37, и 3 штамма были определены как занимающие промежуточное положение между двумя серотипами вируса. В

первом десятилетии XXI века с помощью молекулярно-генетических методов показано абсолютное доминирование (более 80%) сибирского субтипа ВКЭ в большинстве обследованных районов Иркутской области [13—15].

В то же время, изучая большие коллекции сибирского варианта ВКЭ, исследователи обращали внимание на его выраженную генотипическую изменчивость [12]. Филогенетический анализ 86 последовательностей изолятов ВКЭ, относящихся к сибирскому субтипу, показал, что существуют так называемые азиатский и европейский его топоварианты. Азиатский топовариант представлен как минимум двумя значительными группами изолятов с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко [16].

Цель данного исследования — изучение группы штаммов ВКЭ, выделенных с 2006 по 2014 г. в разных районах Иркутской области, и уточнение в этой связи генотипического пейзажа ВКЭ в регионе на настоящее время.

Материал и методы

Голодных имаго *Ixodes persulcatus* собирали на флаг с конца апреля до начала июля в 2006—2014 гг. на нескольких территориях Иркутской области с длительно существующими природными очагами КЭ (табл. 1). Мелких млекопитающих отлавливали ловушками Геро на тех же участках в июле—сентябре. Кровь больной с диагнозом «клещевой энцефалит?» была направлена на исследование в нашу лабораторию из ОГБУЗ «Иркутская областная инфекционная клиническая больница».

Клещей исследовали индивидуально иммунофермент-

Таблица 1

Места сбора материала, результаты серологического исследования и изоляции штаммов ВКЭ (2006—2014)

Место сбора материала	Исследовано в ИФА/из них положительных	Вирусофорность, %	Способ изоляции			Всего изолятов ВКЭ
			БМ	КК СПЭВ	ОТ-ПЦР	
Клещи						
Байкальский тракт, 23 км	1887/19	1,0 ± 0,23	7	0	0	7
То же, 30 км	74/1	1,4 ± 1,34	1	0	0	1
" ", 43 км	3756/71	1,9 ± 0,22	26	1	2	29
" ", 47 км	4812/80	1,7 ± 0,18	11	2	1	14
Голоустненский тракт	1036/5	0,5 ± 0,22	1	0	0	1
УОБО	165/8	4,8 ± 1,67	0	9	0	9
Слюдянский район	1474/9	0,6 ± 0,20	4	0	1	5
Итого ...	11522/193	1,5 ± 0,10	50	12	4	66
Мелкие млекопитающие						
Байкальский тракт, 23 км	5/2	40,0 ± 21,91	0	0	0	0
То же, 43 км	64/17	26,6 ± 5,52	2	0	0	2
Слюдянский район	12/0	0 ± 7,12	0	0	0	0
Итого ...	81/19	23,5 ± 4,71	2	0	0	2
Больные люди						
Кровь больной К., укус клеща на 17-м километре Байкальского тракта	н/и	н/и	1	н/и	1	1

Примечание. н/и — не исследовали.

ным методом с помощью набора реагентов ИФА ТС АГ ВКЭ («Микроген», Томск) в соответствии с инструкцией производителя. Из мозга мелких млекопитающих готовили 10% суспензию на физиологическом растворе и исследовали на той же тест-системе.

Из клещевых и мозговых суспензий, показавших положительный и/или сомнительный результат на наличие антигена (АГ) ВКЭ, изолировали вирус на 2—3-дневных сосунках беспородных белых мышей (БМ) [17] со сроком наблюдения 21 день. Часть клещевых суспензий, отрицательных и/или сомнительных по результатам ИФА, преимущественно с территорий с низкой численностью клещей (Усть-Ордынский Бурятский округ — УОБО) исследовали на микрокультуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) по наличию цитопатического действия (ЦПД) [17] с последующим тестированием в ИФА и закреплением в пассажах на мышах.

Для оценки нейровирулентности и периферической активности изоляты ВКЭ титровали на БМ массой 6—8 г путем их внутримозгового (по 0,03 мл) и подкожного (по 0,25 мл) заражения. За животными наблюдали 14 дней. Титр вируса вычисляли методом Рида и Менча [17]. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности (ИИ) — разности титров вируса при церебральном и подкожном заражении ($\lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$). Работу на животных выполняли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н от 23.08.2010).

Положительные по результатам ИФА суспензии клещей и мозга мелких млекопитающих в 2012—2014 гг. верифицировали в обратнотранскриптазной полимераз-

ной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (набор реагентов АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis/E. muris*-FL ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора РФ, Москва). Вирусную РНК из суспензий выделяли с помощью набора АмплиПрайм® РИБО-преп (ООО «НекстБио», Москва). Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов РЕВЕРТА-L-100 (ЦНИИ эпидемиологии).

ПЦР-продукт гена E получали с помощью набора реагентов ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) («Синтол», Москва) и праймеров, любезно предоставленных Л.С. Карань (ЦНИИ эпидемиологии). Полученные ПЦР-продукты визуализировали в 1% агарозе и затем выделяли согласно стандартной методике [18] с некоторыми модификациями. ПЦР-продукты секвенировали с использованием набора реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL («Applied Biosystems»). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности проводили в программе BioEdit v. 7.0.5.3 [19]. Бескорневое филогенетическое BioNJ-дерево построено с помощью программы Splits Tree4 [20].

Для статистической обработки результатов использовали общепринятые непараметрические методы: точный критерий Фишера, U-критерий Вилкоксона, Манна - Уитни [21]. Расчеты проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и Statistica.

Результаты и обсуждение

За 9 лет разными методами от клещей, мелких млекопитающих и из крови больной выделено 65 штаммов ВКЭ и 4 изолята РНК (см. табл. 1). Большая часть суспензий, содержащих АГ ВКЭ, не вызвала видимых проявлений болезни при заражении БМ. Из клещевых суспензий вирус удалось выделить в 25% случаев, из мозговых суспензий мелких млекопитающих — в 10,5%. Высокое содержание АГ в клещах увеличивало вероятность изоляции штаммов на БМ ($p > 0,01$). В большинстве (86,8%) случаев мыши заболели при первичном заражении. Инкубационный период колебался в широком диапазоне (табл. 2) и в среднем составил 6,5 сут, в последующих пассажах — 3—4 сут.

При заражении клеточных культур (КК) СПЭВ отрицательными и сомнительными по результатам ИФА суспензиями клещей ($n = 299$) было изолировано 12 штаммов ВКЭ: 9 из УОБО и 3 с Байкальского тракта. Следует отметить, что из слабоположительных по результатам ИФА клещей на уровне слепого пассажа на БМ, а также из отрицательной суспензии на КК было изолировано 3 штамма, при генотипировании оказавшиеся ВКЭ европейского субтипа.

Для расшифровки нуклеотидных последовательностей штаммы ВКЭ брали в работу не позднее уровня 1 пассажа, поскольку геном вируса может претерпевать изменения при адаптации к лабораторным животным [22]. В 4 случаях удалось секвенировать участок гена E

Генетическая принадлежность изолятов и биологические свойства групп штаммов ВКЭ с разных территорий

Место сбора материала	Количество изолятов*	Генотипированы		Вариант сибирского генотипа		Инкубационный период при 1-м заражении мышей, сут	Инкубационный период в пассажирах, сут	Церебральная активность**	Периферическая активность**	ИИ
		сибирский тип	европейский тип	Васильченко	Заусаев					
Байкальский тракт, 17 км#	1	1	0	0	1	4	3	10,1	9,1	1
Байкальский тракт, 23 км	7	7***	0	1	5	4—7	3—4	7,0—10,9	4,8—8,3	1,0—3,0
Байкальский тракт, 30 км	1	1	0	1	0	7	3	10,2	6,9	3,3
Байкальский тракт, 43 км	31*	28	3	23	5	4—18	3—4,5	6,9—11,0	3,3—9,9	0,8—3,7
Байкальский тракт, 47 км	14*	12	1	10	2	3—14	3—4	6,2—10,7	4,5—9,3	1,1—2,8
Голоустненский тракт	1	1	0	1	0	5—8	4	9,1	8,2	0,9
УОБО	9	9	0	9	0	КК	3	8,1—11,5	7,1—9,3	1,0—2,4
Слюдянский район	5*	5	0	5	0	5—15	3—4	9,2—10,0	7,1—8,1	1,1—2,9

Примечание. * — с учетом изолятов РНК; ** — Ig ЛД₅₀/мл; *** — 1 штамм — сибирский тип; # — кровь больной, укушенной клещом на 17-м километре Байкальского тракта.

непосредственно в клещевой суспензии, в 2 случаях — в мозговой суспензии после первичного заражения БМ.

Генотипирование 64 штаммов и 4 РНК-изолятов ВКЭ (фрагмент гена E, 1193 п. н.) показало, что 94,1% из них принадлежали к сибирскому субтипу и 5,9% — к европейскому. Ни одного штамма восточного субтипа обнаружено не было.

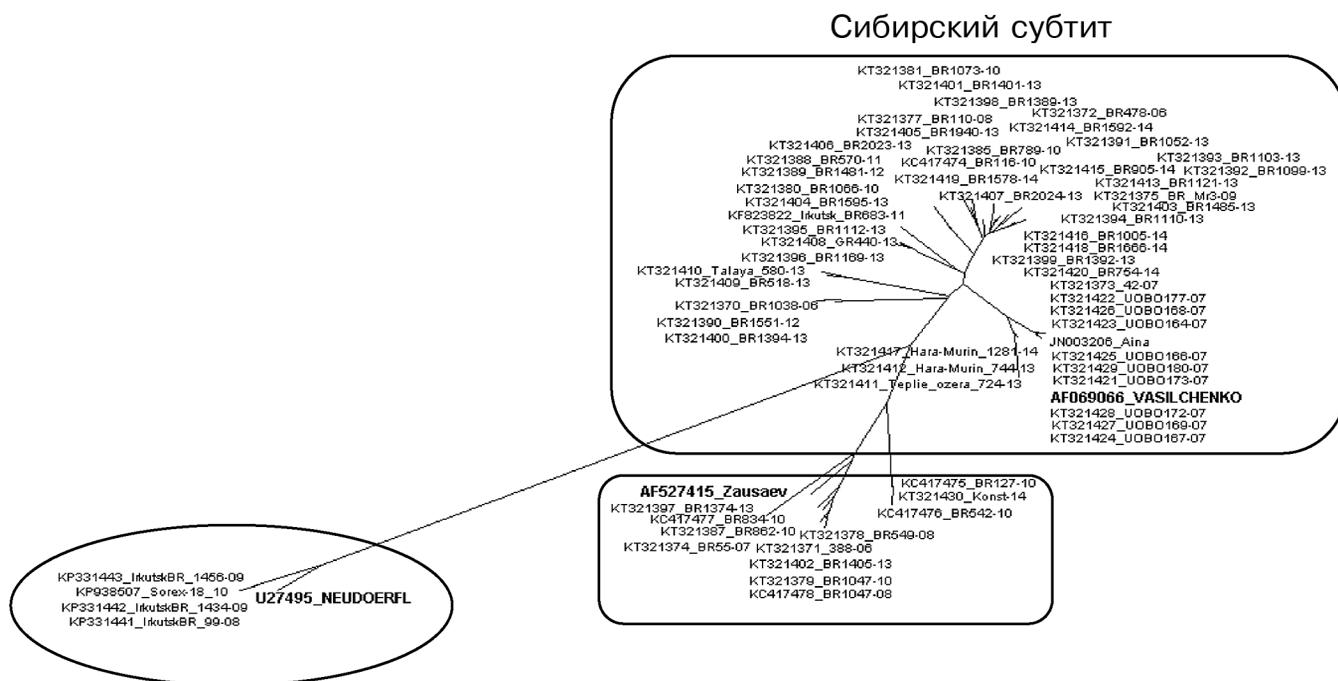
Циркуляция в регионе европейского субтипа отмечалась еще с 70-х годов прошлого века: антитела (АТ) к АГ западного (штамм 256) варианта обнаруживали в 6,6% сывороток крови людей [23]. В начале XXI века наличие в Прибайкалье штаммов ВКЭ европейского субтипа было подтверждено молекулярными методами (5,7% от числа исследованных) [14]. Большинство из них было выделено от больных людей или мелких млекопитающих.

На филогенетическом древе изоляты сибирского субтипа разделились на 2 большие группы: подавляющее большинство (79,4%) оказалось в кладе с прототипным штаммом Васильченко, остальные — в кладе с прототипным штаммом Заусаев. Примечательно, что в группу Заусаев попали изоляты только с Байкальского тракта — территории с наибольшей степенью риска заражения для жителей Иркутска, по данным литературы и результатам наших исследований [24]. При этом в данной группе оказались 6 из 7 изолятов с участков, расположенных ближе всего к областному центру (17 и 23 км Байкальского тракта) — территории с большой концентрацией садоводств. Между тем с распространенностью этого субтипа связывают ухудшение клинического течения и рост числа очаговых форм КЭ в некоторых регионах [5].

Генотипический пейзаж на отдаленных от города и наименее затронутых антропогенным воздействием лесных участках, прилегающих к Байкальскому тракту, оказался наиболее разнообразным: здесь циркулируют 2 субтипа вируса и 2 варианта сибирского субтипа (см. табл. 2). При этом в выборках с 43-го и 47-го километров преимущественно обнаружены штаммы сибирского субтипа из группы Васильченко, а с 17-го и 23-го — Заусаев. Сравнение распределений частоты встречаемости вариантов сибирского субтипа на двух расположенных рядом участках (43 и 47 км Байкальского тракта) по точному

критерию Фишера показало отсутствие различий между ними ($p = 1$). Это позволило объединить данные выборки для дальнейшего анализа. Сопоставление распределений вариантов штаммов, полученных с 43-го, 47-го и 17-го, 23-го километров, показало существенную степень различий между ними ($p = 0,001$). Все изоляты с прочих обследованных нами территорий относились к варианту Васильченко (см. табл. 2). Между встречаемостью субтипов, обнаруженных в УОБО и на 17-м и 23-м километрах Байкальского тракта, наблюдается высокая степень неоднородности ($p = 0,0009$), тогда как статистически значимые различия между выборками из УОБО и с 43-го и 47-го километров не выявлены ($p = 0,3221$). На рисунке хорошо видно, что ветви, образуемые группами штаммов на филогенетическом древе, больше связаны с местом, чем с годом выделения изолята. Следует отметить, что все современные изоляты из УОБО практически не отличаются от прототипного штамма Айна/1448, выделенного на территории округа почти полвека назад.

Соотношение показателей вирулентности для БМ при введении вируса в мозг и экстраневральным путем является индивидуальной характеристикой, маркером каждого штамма [25]. Подавляющее большинство (88,7%) исследованных нами штаммов были высоковирулентны при периферическом пути введения (6 и более lg ЛД₅₀/мл), 6 — умеренно вирулентны (от 4,1 до 5,9 lg ЛД₅₀/мл) и только 2 — слабовирулентны (меньше 4 lg ЛД₅₀/мл). Все 4 штамма европейского субтипа оказались высоковирулентными для БМ, что согласуется с меняющимися на сегодняшний день представлениями о его слабой патогенности [26]. ИИ превышал 2,5 lg у 19,4% штаммов и лишь в трех случаях совпал с умеренной и низкой вирулентностью для мышей при периферическом пути введения. Штаммы от млекопитающих (красно-серая полевка КСП-3 и бурозубка Б-18) были высоковирулентны для БМ при обоих путях введения и по биологическим свойствам не отличались от основной массы штаммов, выделенных из клещей. На филогенетическом древе штаммы от млекопитающих оказались на одной ветви с клещевыми штаммами с той же территории (43 км Байкальского тракта). Это подтверждает мнение других исследователей о



Филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей штаммов вируса КЭ, выделенных на территории Иркутской области в 2006—2014 гг. Прописными буквами и жирным шрифтом выделены прототипные штаммы.

корреляции между географической и филогенетической кластеризацией независимо от хозяина [12, 27]. Штаммы с разной степенью вирулентности для ЛМ также не образовали отдельных клад, хотя для дальневосточных изолятов от пациентов с разной степенью тяжести заболевания КЭ показано разделение на кластеры [28, 29]. Вероятно, для выявления факторов, влияющих на патогенность, необходимо исследование полного генома штаммов.

Для обнаружения различий между группами штаммов Васильченко и Заусаев мы сравнили их по нескольким параметрам: успешности изоляции в зависимости от количества АГ в клеще (по величине экстинкции), доле изолятов при первичном заражении, частоте встречаемости штаммов с высокой периферической активностью и нейроинвазивностью для БМ. Статистически достоверные различия для имеющейся выборки были получены только по длительности инкубационного периода при первичном заражении сосунков БМ. Средние значения данного параметра у групп штаммов Заусаев и Васильченко составили соответственно 4,8 и 7,3 сут. Сравнение этих показателей по U-критерию Вилкоксона, Манна-Уитни показало их существенную разницу ($U = 54,5; z = 3,30; n_1 = 10; n_2 = 35; p < 0,001$). Это позволяет заключить, что исследованная нами группа штаммов Заусаев значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению со штаммами Васильченко.

Выводы

1. Генотипический пейзаж ВКЭ в Прибайкалье в настоящее время претерпевает изменения, характеризующиеся абсолютным преобладанием сибирского субтипа, представленного двумя группами с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко.

2. Группа штаммов Васильченко распространена на всей обследованной территории, штаммы группы Заусаев изолированы в основном в ближайших пригородах Иркутска.

3. Европейский генотип ВКЭ в природных очагах Прибайкалья циркулирует постоянно, и его штаммы обладают высокой вирулентностью для БМ. Доказательством постоянства его циркуляции является выделение штаммов на протяжении многих лет из разных источников в природных очагах КЭ, а также его участие в формировании иммунитета и патологии населения.

4. ВКЭ дальневосточного субтипа в группе изолятов 2006—2014 гг. не обнаружен.

5. Филогенетическое родство исследованных штаммов больше связано с местом, чем с годом и источником выделения изолята.

Благодарность

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории природно-очаговых инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора РФ С.А. Борисову, Т.И. Борисовой, Д.Б. Вержуцкому, Ю.А. Вержуцкой, Е.А. Вершинину, П.Е. Вершинину, М.О. Гориной, Г.В. Зимаревой, И.М. Морозову, Е.Т. Петровой, Н.Н. Пивень, А.В. Севостьяновой, Е.А. Сидоровой, А.Г. Трухиной, А.В. Холину, С.Э. Худченко, Р.А. Шиваренко, Н.В. Яковичу и сотрудникам Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН Н.Е. Красноштановой и С.И. Лесных, принимавшим в разные годы участие в сборе материала.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 19, 20, 26—29
см. REFERENCES)

5. Конькова-Рейдман А.Б., Тер-Багдасарян Л.В., Злобин В.И. Изучение генетической структуры природных популяций вируса и эпидемиология клинических форм клещевого энцефалита на Южном Урале. *Инфекционные болезни*. 2013; 11(Приложение 1): 204—5.
6. Погодина В.В. Актуальные проблемы клещевого энцефалита на современном этапе. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (1): 11—5.
7. Герасимов С.Г. Эволюция клещевого энцефалита в Центральном федеральном округе России. *Моделирование смены подтипов возбудителя в эксперименте*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2012.
8. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007; (5): 10—6.
9. Краминская Н.Н., Живольяпина Р.Р., Мейерова Р.А. Своеобразный штамм вируса КЭ, выделенный от больного с прогрессивным течением заболевания. В кн.: *Актуальные проблемы вирусных заболеваний*. М.; 1965: 190—1.
10. Живольяпина Р.Р. Материалы к изучению штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в Иркутской области. *Доклады Иркутского противочумного института*. 1971; (9): 163—6.
11. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Корешкова Г.В. Свойства штаммов вируса клещевого энцефалита серотипа Айна/1448. *Вопросы вирусологии* 1981; (6): 741—5.
12. Трухина А.Г. Особенности популяций возбудителя клещевого энцефалита в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дисс. ... канд. мед. наук. Иркутск; 1989.
13. Андаев Е.И. Научно-организационные основы эпидемиологического надзора за природно-очаговыми и особо опасными вирусными инфекциями в Восточной Сибири: Дисс. ... докт. мед. наук. Иркутск; 2009.
14. Верхозина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Лисак О.В. и др. Эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита в Иркутской области. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2007; (Приложение 3): 79—85.
15. Джиоев Ю.П., Беликов С.И., Демина Т.В., Козлова И.В., Клер С.А., Адельшин Р.В. и др. Характеристика генетической дифференциации штаммов вируса клещевого энцефалита на территории Сибири. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2004; (1-3): 112—6.
16. Карань Л.С., Погодина В.В., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Маленко Г.В. и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. 2. Генетические кластеры. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (1): 87.
17. Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. Перевод с английского. М.: Мир; 1988.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир; 1984.
19. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Статистика; 1976.
20. Дрокин Д.А., Злобин В.И., Карганова И.Г., Вихорева Т.В., Якименко В.В., Дживанян Т.И. и др. Изменение геномов штаммов вируса клещевого энцефалита в результате пассажей на мышах. *Вопросы вирусологии*. 1994; (4): 160—2.
21. Горин О.З., Васенин А.А., Ценев Л.В., Зарубинский В.Я. Результаты серологического обследования на арбовирусы населения южных районов Восточной Сибири. В кн.: *Вопросы краевой эпидемиологии и иммунологии*. Ленинград; 1977: 15—8.
22. Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Корзун В.М., Сидорова Е.А., Андаев Е.И. Особенности территориального распределения заболеваемости клещевым энцефалитом среди жителей г. Иркутска. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2012; (2-1): 104—9.
23. Погодина В.В. *Вирусы антигенного комплекса клещевого энцефалита (биология, дифференциация, нейровирулентность и связанные с ней особенности патогенеза и иммунологии)*: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.; 1966.
24. genetical structure of the natural viral populations and the epidemiology of tick-borne encephalitis clinical forms in the South Urals. *Infektsionnye bolezni*. 2013; 11(Suppl. 1): 204—5. (in Russian)
25. Pogodina V.V. The actual problems of tick-borne encephalitis nowadays. *Meditsinskaya virusologiya*. 2013; XXVII (1): 11—5. (in Russian)
26. Gerasimov S.G. *The Evolution of Tick-Borne Encephalitis in the Central Federal Ocrug of Russia. Experimental Modeling of the Agent Subtypes Changing*: Diss. Moscow; 2012. (in Russian)
27. Loktev V.B., Ternovoy V.A., Netesov S.V. Molecular and genetic characteristics of tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2007; (5): 10—6. (in Russian)
28. Kraminskaya N.N., Zhivolyapina R.R., Meyerova R.A. Original tick-borne encephalitis virus strain isolated from patient with chronic form of the disease. In: *Actual Problems of Viral Diseases [Aktual'nye problemy virusnykh zabollevaniy]*. Moscow; 1965: 190—1. (in Russian)
29. Zhivolyapina R.R. The materials for tick-borne encephalitis virus strains study, isolated in Irkutsk region. *Doklady Irkutskogo protivochumnogo instituta*. 1971; (9): 163—6. (in Russian)
30. Pogodina V.V., Bochkova N.G., Koreschkova G.V. Characteristics of the serotype Aina/1448 tick-borne encephalitis virus strains. *Voprosy virusologii*. 1981; (6): 741—5. (in Russian)
31. Trukhina A.G. *The Features of Tick-Borne Encephalitis Virus Populations in the Distribution Area of the Two Viral Serotypes on the Territory of Pribaikalia*: Diss. Irkutsk; 1989. (in Russian)
32. Andaev E.I. *Scientific and Organization Basis of Epidemiological Surveillance for Natural-Focal and Particularly Dangerous Infections in the Eastern Siberia*: Diss. Irkutsk; 2009. (in Russian)
33. Verkhovina M.M., Zlobin V.I., Kozlova I.V., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Lisak O.V. et al. The epidemiological and molecular genetical analysis of tick-borne encephalitis virus population in the Irkutsk region. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; (Suppl. 3): 79—85. (in Russian)
34. Dzhioev Yu.P., Belikov S.I., Demina T.V., Kozlova I.V., Kler S.A., Adel'shin R.V. et al. Characteristics of the tick-borne encephalitis virus strains genetical differentiation in Siberia. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2004; (1-3): 112—6. (in Russian)
35. Karan' L.S., Pogodina V.V., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Gerasimov S.G., Malenko G.V. et al. The Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus dominating in Russia. 2. Genetic clusters. *Meditsinskaya virusologiya*. 2013; XXVII (1): 87. (in Russian)
36. Mahy B.W.J., ed. *Virology. A Practical Approach*. Washington: IRL Press, Oxford; 1985.
37. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. *Molecular Cloning [Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie]*. Moscow: Mir; 1984. (in Russian)
38. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999; 41: 95—8.
39. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23(2): 254—67.
40. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
41. Drokin D.A., Zlobin V.I., Karganova I.G., Vikhoreva T.V., Yakimenko V.V., Dzhivanyan T.I. et al. Changing of the tick-borne encephalitis virus strains as a result of passages on laboratory mice. *Voprosy virusologii*. 1994; (4): 160—2. (in Russian)
42. Gorin O.Z., Vasenin A.A., Tsenev L.V., Zarubinskiy V.Ya. The results of serological investigation of the population of Eastern Siberia southern areas for arboviruses. In: *The Problems of Regional Epidemiology and Immunology [Voprosy kraevoy epidemiologii i immunologii]*. Leningrad; 1977: 15—8. (in Russian)
43. Mel'nikova O.V., Verшинin E.A., Korzun V.M., Sidorova E.A., Andaev E.I. The peculiarities of territorial distribution of the tick-borne encephalitis infection between Irkutsk residents. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2012; (2-1): 104—9. (in Russian)
44. Pogodina V.V. *Viruses of the Tick-Borne Encephalitis Complex (Biology, Differentiation, Neurovirulence and Associated Peculiarities of Pathogenesis and Immunology)*: Diss. Moscow; 1966. (in Russian)
45. Gäumann R., Růžek D., Mühlemann K., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *J. Med. Virol.* 2011; 83(5): 853—63.
46. Fajs L., Durmiš E., Knap N., Strle F., Avsic-Zupanc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48420.
47. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443(1): 89—98.
48. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): e94946.

Поступила 29.09.15
Принята в печать 19.11.15