

- Complex Proteins: Implication of Their Roles in Viral Replication (Thesis)*. Hong Kong; 2017.
33. Hughes D.J., Marendy E.M., Dickerson C.A., Yetming K.D., Sample C.E., Sample J.T. Contributions of CTCF and DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B to Epstein-Barr virus restricted latency. *J. Virol.* 2012; 86(2): 1034–45.
 34. Park E.S., Park Y.K., Shin C.Y., Park S.H., Ahn S.H., Kim D.H. et al. Hepatitis B virus inhibits liver regeneration via epigenetic regulation of urokinase-type plasminogen activator. *Hepatology*. 2013; 58(2): 762–76.
 35. Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y. et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(8): 2242–51.
 36. Zhu M., Guo J., Li W., Lu Y., Fu S., Xie X. et al. Hepatitis B virus X protein induces expression of alpha-fetoprotein and activates PI3K/mTOR signaling pathway in liver cells. *Oncotarget*. 2015; 6(14): 12196–208.
 37. Matsuda Y., Wakai T., Kubota M., Osawa M., Takamura M., Yamagawa S. et al. DNA Damage Sensor γ -H2AX Is Increased in Preneoplastic Lesions of Hepatocellular Carcinoma. *ScientificWorld Journal*. 2013; 2013: 597095.
 38. Ha K., Lee G.E., Pali S.S., Brown K.D., Takeda Y., Liu K. et al. Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(1): 126–40.
 39. O'Hagan H.M., Wang W., Sen S., Destefano Shields C., Lee S.S., Zhang Y.W. et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1 and polycomb members to promoter CpG islands. *Cancer Cell*. 2011; 20(5): 606–19.
 40. Jin B., Robertson K.D. DNA Methyltransferases (DNMTs), DNA Damage Repair, and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 754: 3–29.
 41. Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X. et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*. 2014; 343(6176): 1221–8.
 42. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8(11): 2281–308.

Поступила 16.04.17
Принята в печать 20.06.17

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 578.833.26:578.53

Дёмина Т.В.¹, Козлова И.В.^{2,3}, Ткачёв С.Е.⁴, Дорощенко Е.К.², Лисак О.В.², Савинова Ю.С.², Сунцова О.В.²,
Верхозина М.М.⁵, Джиоев Ю.П.³, Парамонов А.И.², Киселёв Д.О.³, Злобин В.И.³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОЙ СТРУКТУРЫ СИБИРСКИХ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского», 664038, г. Иркутск;
²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, г. Иркутск;
³ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», 664003, г. Иркутск
⁴ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, 630090, г. Новосибирск;
⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», 664047, г. Иркутск

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ, TBEV) делится на 3 субтипа: дальневосточный (ВКЭ-ДВС, TBEV-FE), европейский (ВКЭ-Евр, TBEV-Eur) и сибирский (ВКЭ-Сиб, TBEV-Sib). В России их также принято называть соответственно генотипами 1, 2 и 3. Географически ВКЭ-Евр доминирует в Центральной и Северной Европе, но его представители встречаются и восточнее — по южной части лесной зоны внетропической Евразии вплоть до Восточной Сибири и Южной Кореи. Однако штаммы, изолированные за пределами Европы, остаются малоизученными. В предлагаемом исследовании определено 8 и сопоставлено 13 полных геномов сибирских изолятов ВКЭ-Евр. Анализ 152 депонированных в GenBank полногеномных последовательностей ВКЭ показал, что ВКЭ-Евр на территории всего евроазиатского ареала обладает более высокой степенью стабильности кодирующей части генома (3,1% различий) по сравнению с ВКЭ-ДВС (6,6%) и ВКЭ-Сиб (7,8%). При этом максимальные показатели различий отмечаются не между европейскими и сибирскими штаммами, как можно было бы ожидать, а между представителями из Европы. Это штаммы Mandl-2009 из Норвегии и Нург из Чешской Республики. Исследованные штаммы из Сибири входят в состав компактного генетического кластера из 42 штаммов ВКЭ-Евр и подразделяются на 2 субкластера — западносибирский и восточносибирский варианты. Эти варианты отличаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Западносибирский вариант в основном циркулирует на территории Алтая, а ближайшим родственником его представителей является штамм Absettarov из европейской части России. Штаммы, аналогичные восточносибирскому варианту европейского субтипа, зафиксированы на Алтае (штамм 84.2, 2007) и в Беларуси (N256, предположительно 1940).

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вирус клещевого энцефалита; генотип; субтип; генетическая вариативность; полипротеин; аминокислотные замены.

Для цитирования: Дёмина Т.В., Козлова И.В., Ткачёв С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Савинова Ю.С., Сунцова О.В., Верхозина М.М., Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., Киселёв Д.О., Злобин В.И. Определение и сравнительный анализ геномной структуры сибирских штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 29-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-29-36>

Для корреспонденции: Дёмина Татьяна Васильевна, д-р биол. наук, проф. каф. фак. биотехнологии и ветеринарной медицины при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского», 664038, г. Иркутск. E-mail: demina2006@mail.ru

Demina T.V.¹, Kozlova I.V.^{2,3}, Tkachev S.E.⁴, Doroshchenko E.K.², Lisak O.V.², Savinova Yu.S.², Suntsova O.V.², Verkhovzina M.M.⁵, Dzhioev Yu.P.³, Paramonov A.I.², Kiselev D.O.³, Zlobin V.I.³

DEFINITION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENOMIC STRUCTURE OF SIBERIAN STRAINS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS OF THE EUROPEAN SUBTYPE

¹ Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Ezhevsky, Irkutsk, 664038, Russian Federation;

² Science Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk, 664003, Russian Federation;

³ Irkutsk State Medical University, Irkutsk, 664003, Russian Federation;

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, 630090, Russian Federation;

⁵ Center of Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is classified into three subtypes: Far Eastern (TBEV-FE), European (TBEV-EU) and Siberian (TBEV-SIB). In Russia, these are also called genotypes 1, 2 and 3, respectively. Geographically, TBEV-EU dominates in Central and Northern Europe, but its representatives are also found to the east – along the southern part of the forest zone of extratropical Eurasia – up to Eastern Siberia and South Korea. However, the strains isolated outside Europe remain poorly investigated. In the proposed study, eight full genomes of the Siberian isolates of TBEV-EU were determined and 13 complete genomes were compared. The analysis of 152 full-genome TBEV sequences showed that the TBEV-EU has a higher degree of stability of the genome-coding region in the entire Eurasian area (3.1% of differences) compared to TBEV-FE (6.6%) and TBEV-SIB (7.8%). At the same time, the maximum differences are observed not between European and Siberian strains, as one could expect, but between the representatives from Europe – TBEV strains Mandl-2009 from Norway and Hypr from the Czech Republic. The studied strains from Siberia form the compact genetic cluster of 42 TBEV-EU strains and are divided into two subclusters – West Siberian and East Siberian variants. These variants differ in the combinations of amino acid substitutions in all proteins except NS2B. The West Siberian variant mostly circulates in the territory of Altai, and the closest relative of its representatives is Absettarov strain from the European part of Russia. The strains similar to the East Siberian variant of the European subtype were recorded in the Altai (strain 84.2, 2007) and in Belarus (N256, about 1940).

Key words: TBE; TBEV; genotype; subtype; genetic variability; polyprotein; amino acids substitutions.

For citation: Demina T.V., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Savinova Yu.S., Suntsova O.V., Verkhovzina M.M., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Kiselev D.O., Zlobin V.I. Definition and comparative analysis of the genomic structure of siberian strains of tick-borne encephalitis virus of the european subtype. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(1): 29-36. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-29-36>

For correspondence: Tatyana V. Demina, Dr. Sci. Biol., Professor of the Department of Biotechnology and Veterinary Medicine, Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Ezhevsky, Irkutsk, 664038, Russian Federation. E-mail: demina2006@mail.ru

Information about authors:

Demina T.V., <http://0000-0003-2459-888X>; Kozlova I.V., <http://0000-0002-6324-8746>;

Lisak O.V., <http://0000-0003-3909-7551>; Suntsova O.V., <http://0000-0003-4057-2890>;

Paramonov A.I., <http://0000-0002-7156-4036>

Acknowledgment. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-00615).

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

Received 13 July 2017

Accepted 17 October 2017

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) — природно-очаговая ней-инфекция, возбудителем которой является вирус, относящийся к семейству *Flaviviridae*. В последние годы в мире расширяются эндемичные области распространения вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и растет заболеваемость КЭ [1]. В России регистрация заболевания введена в 1944 г. С сентября 2012 г. КЭ официально подлежит регистрации в Европейском Союзе [2]. В каталоге Международного комитета по таксономии вирусов ВКЭ подразделяется на 3 субтипа: дальневосточный (ВКЭ-ДВС, TBEV-FE), европейский (ВКЭ-Евр, TBEV-EU) и сибирский (ВКЭ-Сиб, TBEV-Sib) [3, 4], которые в России принято также называть соответственно генотипами 1, 2 и 3. Кроме того, показано, что в Байкальском регионе России циркулируют представители еще двух предполагаемых генотипов, прототипами которых являются штаммы 178-79 (генотип 4) и 886-84 (генотип 5) [5—7]. ВКЭ-ДВС, чаще других вызывающий тяжелые симптомы КЭ, в незначительной пропорции встречается на большей части всего ареала ВКЭ, но преобладает на Дальнем Востоке, обнаружен в Китае и Японии. ВКЭ-Евр доминирует в очагах Центральной и Восточной Европы, является минорным на территории РФ, исключая Алтай, и пока не

выявлен на Дальнем Востоке. Кроме того, ВКЭ-Евр зафиксирован в Южной Корее [8]. ВКЭ-Сиб (или генотип 3) наиболее широко распространён по всему ареалу ВКЭ, доминирует на территории РФ, был изолирован в Казахстане (штамм Алма-Арасан [4]), но информация о его наличии в большинстве европейских стран, а также в Корее и Японии отсутствует. В Иркутской области и Республике Бурятия все три основных субтипа (генотипа) ВКЭ вовлечены в этиологию КЭ [5, 6], и недавно появились первые данные о полногеномных структурах штаммов ВКЭ из Сибири [9—11]. Предлагаемое исследование также посвящено этому вопросу, а именно определению и анализу полногеномной структуры представителей ВКЭ-Евр (или генотипа 2), изолированных на территории Алтая (Западная Сибирь) и Иркутской области (Восточная Сибирь). Среди изолятов ВКЭ, идентифицированных в качестве представителей ВКЭ-Евр, есть штамм 1G-98, полученный на территории Иркутской области в 1998 г. от больного лихорадочной формой КЭ, пострадавшего от укуса клеща в очаге, где штаммы, выделенные от клещей, стабильно определяются как представители ВКЭ-Сиб. Генотипическая принадлежность данного штамма была подтверждена путем секвенирования фрагмента генома (GenBank, KP666097).

Цель данной работы — анализ генетической структуры

Таблица 1

Сибирские штаммы ВКЭ европейского субтипа с известными полногеномными структурами

Штамм	Год изоляции	Источник изоляции	Инв. № GenBank
Западная Сибирь (Алтайский край)			
Zmeinogorsk-1*	1986	<i>Ixodes persulcatus</i>	KY069124 (JN936370)
Zmeinogorsk-5*	1986	<i>persulcatus</i>	KY069125 (JN936373)
Zmeinogorsk-9*	1986	<i>persulcatus</i>	KY069126 (JN936375)
84.2	2007	<i>persulcatus</i>	NM120875
Восточная Сибирь (Иркутская область)			
1G-98*	1998	Человек	KY069119
118-71*	1971	<i>Spermophilus undulatus</i>	KY069120 (KT895091)
126-71*	1971	<i>I. persulcatus</i>	KY069123 (JN936333)
163-74*	1974	<i>persulcatus</i>	KY069121 (JN936334)
262-74*	1974	<i>persulcatus</i>	KY069122 (JN936338)
Sorex 18-10	2010	<i>Sorex spp.</i>	KP938507
IrkutskBR1456	2009	<i>persulcatus</i>	KP331443
IrkutskBR1434	2009	<i>persulcatus</i>	KP331442
IrkutskBR99	2008	<i>persulcatus</i>	KP331441

Примечание. * — штаммы, геномы которых были расшифрованы в ходе данного исследования.

штаммов европейского субтипа ВКЭ, изолированных на территории Сибири, по результатам сопоставления фрагментов генома и полногеномных последовательностей.

Материал и методы

Штаммы ВКЭ. В работе использовали штаммы ВКЭ из музейной коллекции Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека Иркутска (табл. 1). Штаммы выделяли путем внутримозгового заражения 1—3-дневных мышей-сосунков вирусной суспензией и после 2—3 пассажей на мышях хранили в лиофилизированном виде. Перед началом исследований их восстанавливали путем внутримозгового заражения белых мышей массой 5—6 г. Содержание животных и их умерщвление осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Нуклеотидные последовательности геномов штаммов ВКЭ для сравнительного анализа были определены нами в ходе настоящей работы или взяты из международной компьютерной базы данных GenBank.

Выделение РНК осуществляли с помощью набора РИБО-преп («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Аmplификация ДНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Reverta L-100 («АмплиСенс», Россия), содержащего случайные гексаолигонуклеотиды. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в 20 мкл реакционной смеси в соответствии с инструкциями производителя («БиоСан», Россия) с применением 3 мкл кДНК в качестве матрицы и пары соответствующих праймеров (табл. 2).

Секвенирование ДНК. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных на GFX-колонок («Amersham Biosciences», США) были определены с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Анализ последовательностей ВКЭ проведен с помощью программы MEGA 6.0 [12].

Результаты

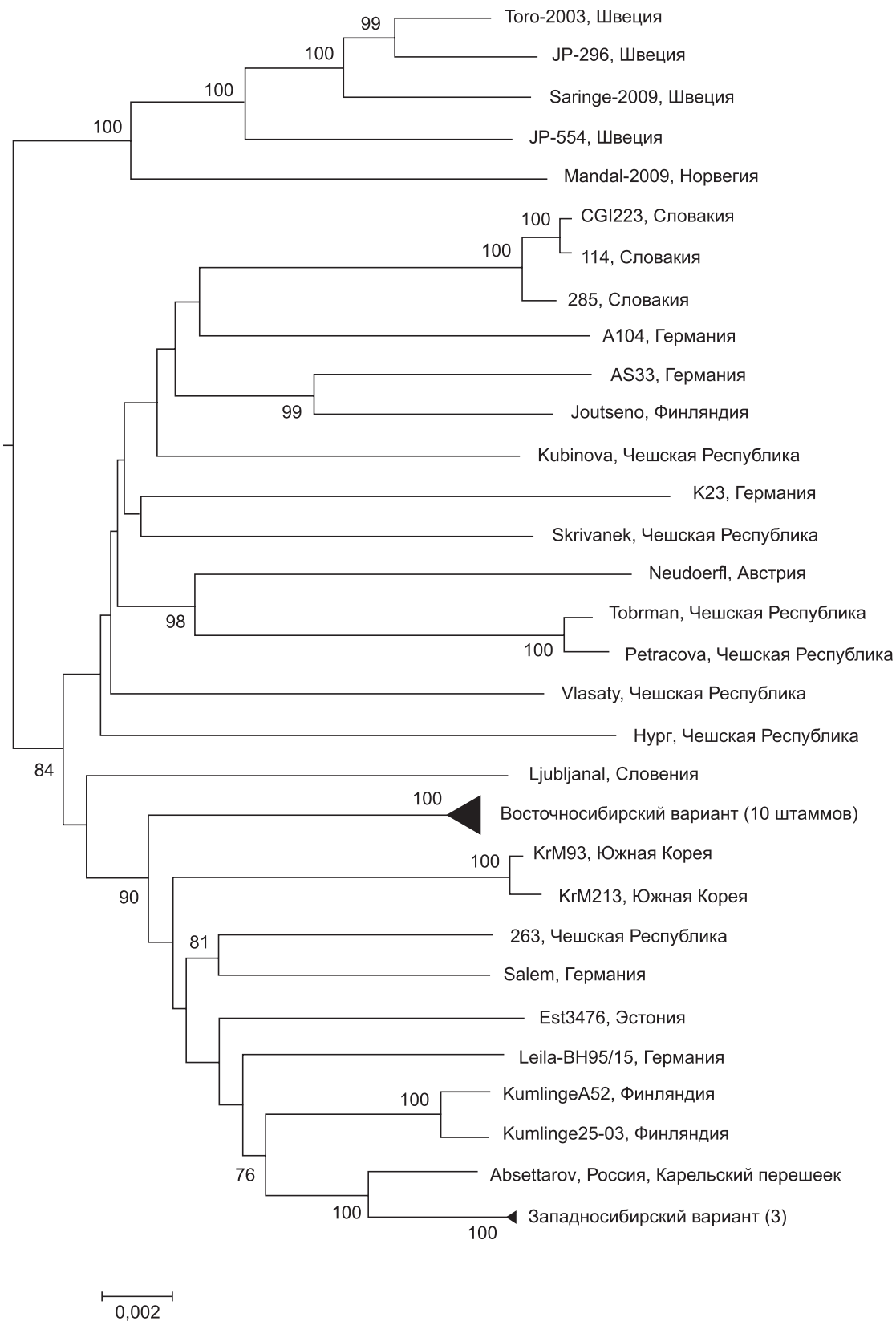
Расшифровано 8 полногеномных последовательностей штаммов, изолированных на территории Сибири (см. табл. 1), генотипическая принадлежность которых к ВКЭ-Евр предварительно была подтверждена с помощью методов молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) [7] и секвенирования фрагментов генома (см. номера депонентов GenBank в табл. 1, указанные в скобках). Проанализированы полногеномные последовательности всех 152 штаммов ВКЭ, депонированных в GenBank (табл. 3). При филогенетическом сопоставлении этих последовательностей исследуемые штаммы из музейной коллекции, как и ожидалось, вошли в состав группы ВКЭ-Евр (см. рисунок). Всего в этой группе было 42 представителя, 13 из которых изолированы на территории Сибири (см. табл. 1).

При сравнении как кодирующей области генома, так и соответствующей ей последовательности полипротеина среди групп штаммов трёх основных генотипов различия между штаммами европейского генотипа оказались минимальными (3,1 и 1,5% соответственно) по сравнению с дальневосточным и сибирским генотипами. Это свидетельствует о более высокой степени их генетической однородности, чем у штаммов дальневосточного

(6,6 и 2,9%) и сибирского (7,8 и 4,2%) генотипов. При этом наименее тесные филогенетические отношения выявляются между представителями ВКЭ скандинавского полуострова (Швеция и Норвегия) и штаммами, изолированными в очагах всего остального ареала, включая территории других европейских стран, а также России и Южной Кореи. Максимальные показатели различий выявлены между штаммами Mandl-2009 из Норвегии и штаммом Нург из Чешской Республики.

При сопоставлении вновь расшифрованных последовательностей друг с другом оказалось, что сибирские штаммы образуют 2 группы, соответствующие географическому положению мест их изоляции. Длина генома у алтайских штаммов составляет 10 825 нуклеотидных оснований (н.о.), а у восточносибирских — 10 905 н.о. Как и у других известных представителей ВКЭ-Евр, геномы исследуемых штаммов содержат по 132 нуклеотида в 5'-некодирующей области (100% гомологии в обеих группах и 3% различий между группами) и по 10 242 н.о. в области, кодирующей полипротеин-предшественник 3 структурных и 7 неструктурных вирусных белков (более 99,9% гомологии внутри групп и 99,9% гомологии между группами). 3' — нетранслируемый участок исследуемых геномов сопоставим по протяженности и структуре с аналогичной областью штамма Нург (461 н.о.) и составляет для штаммов, выделенных на Алтае, 451 н.о., а для штаммов из Восточной Сибири — 531 н.о.

По итогам сравнения полной кодирующей области у 42 штаммов ВКЭ-Евр, изолированных из разных частей обширного ареала, установлено, что штаммы восточносибирского варианта сибирской популяции имеют по 97,4% гомологии с прототипным штаммом Neudoerfl, а представители западносибирского варианта — по 97,6%. В состав восточносибирского варианта вошли 9



Группа ВКЭ-Евр, сформированная в результате сопоставления кодирующей области 152 полногеномных последовательностей ВКЭ с помощью компьютерной программы MEGA 6.0 [12] методом объединения ближайших соседей с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации и секвенирования

ПЦР-фрагмент	Праймер	Последовательность (5'—3')	Позиции в геноме ВКЭ (штамм Neudoerfl (U27495))
1	E23	AGATTTTCTTGCACGTGC	1—18
	E25R	CCTGGTCTATGGTCACACACTC	625—646
2	E27	ACTGTGATCAGGGCTGAAGG	511—530
	E27R	GGAGCCAGGCAGAGGAGCAC	943—962
3	E29	TGACCGTGGAAAGTGTGG	902—919
	E24	CTCTTCAGCCAAAGTGGC	1210—1227
4	E3	TCAATGGATGTGTGGCTTGA	1090—1109
	E5R	TGCACAACAAGGACACATCTCC	1510—1531
5	Ef1	GAGGAAGACGGCATCCTTCAC	1449—1469
	Er1	CATCAATGTGCGCCACAGGAAC	1783—1804
6	E31	CTGGTTGAATTTGGAGCTCC	1693—1712
	E31R	GGTGTATCAGCATGGCCAC	2032—2051
7	E33	CCCAGTGGGGCAGTGGCAC	1992—2011
	E4	CTCATGTTTCAGGCCAACCA	2368—2387
8	E7	GGCATAGAAAGGCTGACAGTG	2197—2217
	E10	GATACCTCTCTCCACACAACCAG	2515—2537
9	E35	TGGTTGGGCCTGAACATGAG	2368—2387
	E35R	CGTGTGTTGGTTCCTGTCTG	2973—2992
10	E12F	TTTGGAGTTGGCTGAGAAC	2935—2954
	E12	CACCTTGCCACTCTCTGTGG	3365—3384
11	E13	ACAGGTGAAAGGACCATGGAAG	3249—3270
	E13RS	GTCACCATCTCTCGGACAGTG	3819—3839
12	E14F	TGTGTTTGAGCTGAGGGTGG	3765—3784
	E14	TCCACACAGCCACTCCATTC	4363—4382
13	E15-W	AGACGATCTTTCAGTGAACCAC	4201—4222
	E15R	CTGCACTGTCTCACCTTTCC	4874—4893
14	E16F	TGTCCTGCACACGATGTGGC	4740—4759
	E16	CAGGCGTCTGTTGACATAGG	5408—5427
15	E17	GGAAGACCCACAGAGTCCTC	5210—5229
	E17R	CTGGAGTAGTCTTCTCAAAGG	5783—5804
16	E18FS	GATGTTTGACTGGATCAC	5653—5672
	E18RS	CAATGAGTGAGAAGGTGTCG	6205—6224
17	E19	AGGACAAGATGCCAGAGGTGG	6143—6163
	E19RS	AGGGAGGCCAGCAGTACCAG	6715—6734
18	E20FS	CATCTGGTGCTTCGTTGTCC	6663—6682
	E20	GTCCAGACACCACAATGGCC	7272—7291
19	E21F	GTTCACACCATACATATCCACC	7059—7081
	E21RS	AGCCAGAGTCGGTGCCCAAG	7624—7643
20	E22F-W	AGGCCGGAGGCTGACACACTGTG	7537—7559
	E22R-W	CTCACCTCCACAGCGCATCTG	8120—8142
21	E23F	TGAAACTCCAAAGATGGTGACAAG	7995—8018
	E23R	GCGTTCCATGGCCAGCTGAG	8650—8669
22	NS5-1F	GACATGGCAGTATTGGGGCAG	8571—8591
	NS5-1R	GCTCCCCAGCCACATGTACC	9092—9111
23	NS5-2F	GCAGCTCGTGGATGAAGAGAGAG	8964—8986
	NS5-2RS	CCACTGACGAGCATTTCTTCC	9634—9653
24	NS5-3F	CACCCTCACCAACATAAAGG	9501—9520
	NS5-3R	TGCATGAAGGGGTTGTCC	10 125—10 142
25	NS5-4F	GGAGCCTGGATGACCACAG	10 069—10 087
	NS5-4R	TCCAGGTTTTGCTCAGTCAC	10 387—10 406
26	3UTR-1F	GCCAAGAACATTTGGGGAGC	10 246—10 265
	3UTR-1R	CTTCCCTCCTCCCGGAAGC	10 968—10 986
27	3UTR-2F	CAGTGAGAGTGGCGACGGG	10 844—10 862
	3UTR-2R	AGCGGGTGTTTTTCCGAGTC	11 122—11 141

штаммов из Иркутской области и штамм 84.2 с Алтая. Различия по кодирующей части генома в этой группе из 10 штаммов не превышают 0,5%. Алтайские штаммы Zmeinogorsk-1, Zmeinogorsk-5 и Zmeinogorsk-9 составили группу западносибирского варианта (более 99,9%). Наиболее близким к ним по уровню гомологии оказался российский штамм Absettarov, изолированный в 1951 г. от больного КЭ человека, инфицированного в природном очаге, расположенном на Карельском перешейке (99,3% гомологии по кодирующей части генома со штаммами из Змеиногорска и 97,7% — со штаммом Neudoerfl).

В результате анализа всех представленных в GenBank нуклеотидных последовательностей (фрагментов генома в том числе) установлено, что сибирская популяция ВКЭ-Евр оказалась представлена двумя группами штаммов, обозначенными нами как восточносибирский и западносибирский варианты. Циркуляция восточносибирского варианта подтверждена в период с 1971 по 2010 г. в Восточной Сибири (9 штаммов из Иркутской области), в 2007 г. — в Алтайском крае (штамм 84.2, изолированный из *I. persulcatus*) и Беларуси (штамм № 256 из *I. ricinus*) предположительно в 1940 г. Западносибирский вариант европейского субтипа зарегистрирован на территории Алтая в 1986 г. (3 штамма из Змеиногорска) и в 2007 г. (Altay-103). Наиболее близкий по степени гомологии к этой группе штамм Absettarov был изолирован в европейской части ареала.

При сопоставлении 42 полипротеиновых последовательностей ВКЭ-Евр по 3414 аминокислотных остатков каждая вне зависимости от источника выделения восточносибирский и западносибирский варианты расходятся по сочетаниям аминокислотных замен в 29 позициях у 9 из 10 белков вируса (табл. 4), причём в белке Е присутствует всего одна такая позиция (Е-246). В то же время по двум другим позициям этого белка — Е-21 и Е-335 — наблюдается дивергенция восточносибирского варианта сибирской популяции ВКЭ-Евр (см. табл. 4; 5). Ни одной замены не было обнаружено в белке NS2B.

При сравнении известных транслированных фрагментов генома ВКЭ оказалось, что замена А→S (Е-47) у восточносибирского штамма Sorex18-10 характерна не только для представителей ВКЭ-ДВС и ВКЭ-Сиб (см. табл. 5), но имеется также у штамма 886-84 — прототипа предполагаемого генотипа 5 и еще у двух штаммов ВКЭ-Евр. Это изоляты РНК из клещей *I. ricinus* — Bul_175_10 (инвентарный номер KC154175; выделен в 2010 г.) в Германии и LU_Dagmarsellen3

Таблица 3

Территориальная и генотипическая принадлежность штаммов ВКЭ с расшифрованными полногеномными последовательностями (на июнь 2017 г.)

Страны	Генотип					Итого
	1	2	3	4	5	
Россия	76	14	16	1	1	110
Азия						
Киргизия	—	—	1	—	—	
Монголия	—	—	3	—	—	
Китай	6	—	1	—	—	15
Южная Корея	—	2	—	—	—	
Япония	2	—	—	—	—	
Европа						
Австрия, Чешская Республика, Германия,						
Словения, Словакия	—	17	—	—	—	
Эстония	—	1	2	—	—	27
Латвия	—	—	1	—	—	
Норвегия, Швеция, Финляндия	—	8	—	—	—	
Всего...	84	42	24	1	1	152

(НМ468144; 2009 г.) — в Швейцарии. Кроме того, замена А→V в позиции E-246 у штаммов из Змеиногорска обнаружена у изолята 2201 (КС292217), полученного из пула клещей, собранных в Германии. Вид клещей и год изоляции геномной РНК авторами не указаны.

Обсуждение

Известно, что очаги КЭ на территории Сибири формируются под действием сурового резко-континентального климата и существенно отличаются по ландшафтным особенностям, составу переносчиков и резервуарных хозяев как друг от друга, так и от очагов на территории Европы, которая, являясь зоной доминирования ВКЭ европейского субтипа, расположена в умеренном климатическом поясе. Тем не менее все известные штаммы ВКЭ-Евр, изолированные на территориях от крайних западных (Норвегия, Германия) до крайних восточных границ ареала (Южная Корея), отличаются более высокой степенью гомологии друг от друга, чем штаммы внутри групп, соответствующих ВКЭ-ДВС и ВКЭ-Сиб. Следовательно, можно заключить, что ВКЭ европейского субтипа на территории Евразии обладает высокой степенью стабильности генома, хотя существует в условиях значительно различающихся очаговых экосистем.

Сибирские штаммы по итогам сравнения нуклеотидных последовательностей (полных геномов и их фрагментов) распределились по двум группам — западносибирскому и восточносибирскому вариантам ВКЭ-Евр. Западносибирский вариант ВКЭ-Евр демонстрирует устойчивую циркуляцию на Алтае. Судя по представленным здесь данным и сообщению В.В. Якименко и соавт. [13], к западносибирскому варианту ВКЭ-Евр относятся не только штаммы из Змеиногорска и Altay-103 (см. раздел «Результаты»), но также штаммы из Кош-Агачского района Республики Алтай и из Республики

Таблица 4

Аминокислотные замены, характерные для сибирских штаммов ВКЭ-Евр, выявленные при сопоставлении 42 полипротеиновых структур

Белок	Позиция по белку	Штаммы			другие регионы
		западно-сибирский вариант	восточносибирский вариант		
			1971—2007 гг.	2008—2010 гг.	
С	31	A	V		V, A
	77	K			K
prM	147	L			L
	159	A	V		V
E	21	V	V	I	V
	246	V	A		A
	335	T	T	I	T
NS1	154	L	F		F
	174	E	K		E
	237	V	M		V
	287	I	T		T, V, A
NS2A	294	R	K		K
	42	I	V		V
	53	I	M		I, M
NS3	124	S	G(E*)		S, N
	141	I	M		I
	33	L	F		F, L
	447	T	I		T
NS4A	32	R	H		H
	55	V	A		V, A
NS4B	21	Q	R		Q, R
	56	I	V		I
	119	L	F		L, F
NS5	101	K	R		R, K
	290	G	S		S, N
	434	R	H		H, R, Q
	521	K	Q		K, R
	699	A	P		F, V
	701	L	F		F, L
	724	T	A		A, T, S
897	K	R		R, K	

Примечание. В сером поле представлены замены, характерные только для указанной группы штаммов; * — замена, специфичная для штамма 1G-98.

Казахстан (годы изоляции с 1990 по 2010, нуклеотидные последовательности отсутствуют в общем доступе). Примечательно, что к генетическому кластеру западносибирского варианта ВКЭ-Евр тесно примыкает штамм Absettarov из Европейской части России, изолированный 66 лет назад (см. рисунок). Представители восточносибирского варианта ВКЭ-Евр в основном обнаружены в Иркутской области, исключая штаммы 84.2 (Алтай) и 256 (Беларусь). Как видим, очаги изоляции гомологичных последовательностей расположены на значительном удалении друг от друга — более 4 тыс. км.

Таблица 5

Аминокислотные замены в белке E у 13 штаммов генотипа 2 ВКЭ из Западной и Восточной Сибири

Субтип, штамм	№ позиций				
	21	47	67	246	335
Дальневосточный субтип	V	S	D,N	A,V	T
Сибирский субтип	V	S	D,N	A	T
Европейский субтип	V	A	D	A	T
Западносибирские штаммы					
Zmeinogorsk-1*	V	A	D	V	T
Zmeinogorsk-5*	V	A	D	V	T
Zmeinogorsk-9*	V	A	D	V	T
84.2	V	A	D	A	T
Восточносибирские штаммы					
1G-98*	V	A	G	A	T
118-71*	V	A	D	A	T
126-71*	V	A	D	A	T
163-74*	V	A	D	A	T
262-74*	V	A	D	A	T
Sorex 18-10	I	S	D	A	I
IrkutskBR 1456-09	I	A	D	A	I
IrkutskBR 1434-09	I	A	D	A	I
IrkutskBR 99-08	I	A	D	A	I

Примечание. В группе дальневосточного субтипа сопоставлены полипротеиновые структуры 84 штаммов, в группе сибирского субтипа — 24, в группе европейского субтипа — 29; * — штаммы, являющиеся основными объектами настоящего исследования; светло-серым цветом обозначены нехарактерные для генотипа 2 ВКЭ замены, белым шрифтом в темном поле — уникальная (штамм-специфическая) замена.

При сопоставлении полипротеиновых структур эти варианты различаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B (см. табл. 4). Отсутствие замен в NS2B-белке, возможно, связано с той важной ролью, которую он играет в репродукции ВКЭ. Известно, что NS2B-белок образует комплекс с белком NS3, обеспечивая ему правильную конформацию, и выступает в качестве кофактора вирусной сериновой протеазы NS2B-NS3 [14]. Кроме того, было обнаружено, что белок NS2B локализован в местах синтеза вирусной РНК и способен к взаимодействию с белком NS5 и 3'-некодирующей областью, что предполагает его участие в репликации вирусного генома [15]. Поэтому любые изменения в аминокислотной последовательности белка NS2B с большой вероятностью приведут к изменению сайта связывания с NS3 и потере протеазной активности.

У исследованных сибирских штаммов ВКЭ-Евр не выявлено специфических замен, соответствующих определенному источнику выделения, кроме замены D→G в позиции E-67 у штамма 1G-98 (см. табл. 5). Мутация D67G в белке E ранее была отмечена для клона 18А штамма Absettarov из группы ВКЭ-Евр [16, 17], а также описана для одного штамма ВКЭ-Сиб, изолированного от смертельно инфицированного индивидуума в 2001 г. (Yar46-2 (EU444079)), в работе М. Хаснатинова и соавт. [18] и для 7 штаммов ВКЭ-ДВС. Штаммы ВКЭ-ДВС с такой мутацией были выделены в Эстонии

в 1998 г. от *A. agrarius* (Est2546 (DQ393779)), в 1943 г. в северо-западном регионе России (Volkhov-Khromov (FJ214114)) и в 1942 и 1943 гг. на Урале (T-blood (AF091019), Ural-Nina (FJ214119), Ural-Ponomarev (FJ214118), Ural-Belyaeva (FJ214117) и Ural-Antipov (FJ214115)). Значимая аминокислотная замена D→G в позиции E-67 повышает заряд молекулы [16—18]. Пока она выявлена только у отдельных представителей всех трёх основных генотипов ВКЭ и только у изолятов ВКЭ, полученных от млекопитающих (от больных КЭ людей и грызуна). Закономерность это или случайность — покажут дальнейшие исследования.

Закключение

Европейский субтип ВКЭ на территории всего евроазиатского ареала обладает более высокой степенью стабильности генома, чем ВКЭ-ДВС и ВКЭ-Сиб. При филогенетическом сопоставлении 152 имеющихся в общем доступе полногеномных последовательностей ВКЭ штаммы ВКЭ-Евр образуют единый кластер из 42 представителей, в состав которого входят 13 представителей из Сибири. Все сибирские штаммы разделяются на западносибирский и восточносибирский варианты ВКЭ-Евр, поскольку большинство штаммов каждого из двух вариантов изолированы в соответствующем регионе. Эти варианты различаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Штаммы, аналогичные восточносибирскому варианту европейского субтипа, зафиксированы на Алтае (84.2, 2007) и в Беларуси (N256, предположительно 1940), а ближайшим родственником представителей западносибирского варианта ВКЭ-Евр является штамм Absettarov из европейской части России.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 15-00615

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 8, 10—12, 14—16, 18 см. REFERENCES)

- Верхозина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Дёмина Т.В. и др. Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири. Новосибирск: СибАК; 2017.
- Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Джигоев Ю.П., Верхозина М.М., Дёмина Т.В. и др. Видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012; (2-2): 75—82.
- Дёмина Т.В., Джигоев Ю.П., Верхозина М.М., Козлова И.В., Ткачев С.Е., Дорошенко Е.К. и др. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита: географическая вариабельность, определяемая методом молекулярной гибридизации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009; (3): 27—39.
- Андаев Е.И., Беликов С.И., Кулакова Н.В., Борисова Т.И., Сидорова Е.А. Характеристика штамма вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа, изолированного от пациента с прогрессирующим течением болезни. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014; (4): 31—7.
- Якименко В.В., Ткачев С.Е., Макенов М.Т., Малькова М.Г., Любенко А.Ф., Рудакова С.А. и др. О распространении вируса клещевого энцефалита европейского субтипа в западной Сибири и на Алтае. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015; (27): 29—35.
- Козловская Л.И., Осолодкин Д.И., Карганова Г.Г. Анализ молекулярной динамики белков E вариантов ВКЭ на основе разности корреляционных матриц. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. 2013; 27(2): 42—53.

REFERENCES

1. Kunze U. The International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW TBE): Review of 17 years of activity and commitment. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(3): 399—404.
2. Amato-Gauci A.J., Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Euro Surveill.* 2012; 17(42): 2—3.
3. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier Academic Press; 2012.
4. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology.* London: Academic Press. Elsevier; 2015.
5. Verkhozina M.M., Zlobin V.I., Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Demina T.V. et al. *Molecular Epidemiology and Ecology of Tick-borne Encephalitis Virus in Eastern Siberia [Molekulyarnaya epidemiologiya i ekologiya virusa kleshchevogo entsfalitov v Vostochnoy Sibiri].* Novosibirsk: SibAK; 2017. (in Russian)
6. Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Dzhioev Yu.P., Verhozina M.M., Demina T.V. et al. Species and genetic diversity of agents of tick-borne infections in the territory of Eastern Siberia. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2012; (2-2): 75—82. (in Russian)
7. Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: geographical variability, determined by the method of molecular hybridization. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2009; (3): 27—39. (in Russian)
8. Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., Lee I.Y., Lee N.Y., Jeong Y.E. et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8(1): 7—13.
9. Andaev E.I., Belikov S.I., Kulakova N.V., Borisova T.I., Sidorova E.A. Characterization of the virus of tick-borne encephalitis virus of the Siberian subtype isolated from a patient with a progressive course of the disease. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2014; (4): 31—7. (in Russian)
10. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., Andaev E.I., Balakhonov S.V. Complete Genome Sequences of Four European Subtype Strains of Tick-Borne Encephalitis Virus from Eastern Siberia, Russia. *Genome Announc.* 2015; 3(3): 00609—15.
11. Kulakova N.V., Andaev E.I., Belikov S.I. Tick-borne encephalitis virus in Eastern Siberia: complete genome characteristics. *Arch. Virol.* 2012; 157(11): 2253—5.
12. 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.
13. Yakimenko V.V., Tkachev S.E., Makenov M.T., Mal'kova M.G., Lyubenko A.F., Rudakova S.A. et al. On the spread of tick-borne encephalitis virus of the European subtype in western Siberia and the Altai. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii.* 2015; (27): 29—35. (in Russian)
14. Perera R., Kuhn R.J. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11(4): 369—77.
15. Chambers T.J., Nestorowicz A., Amberg S.M., Rice C.M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.* 1993; 67(11): 6797—807.
16. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivianian T.I. et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology.* 2010; 398(2): 262—72.
17. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Karganova G.G. Analysis of the molecular dynamics of TBEV proteins E variants based on the difference of correlation matrices. *Trudy Instituta poliomielitov i virusnykh entsfalitov imeni M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya virusologiya.* 2013; 27(2): 42—53. (in Russian)
18. Khasnatinov M., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S. et al. Non-haemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms of the emergence of new strains via adaptation to European ticks. *PLoS ONE.* 2009; 4(10): e7295.

Поступила 13.07.18
Принята в печать 17.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.831-002:578.833.261-078.33

**Чернохаева Л.Л.¹, Майкова Г.Б.¹, Рогова Ю.В.¹, Романенко В.В.², Анкудинова А.В.³, Килячина А.С.²,
Ворович М.Ф.^{1,4}, Карганова Г.Г.^{1,4}**

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЗАЩИЩЁННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ ОТ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», 620078, г. Екатеринбург;

³ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзор, 620072, г. Екатеринбург;

⁴ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва

При изучении иммунной прослойки населения и для оценки иммуногенности вакцинных препаратов обычно используют метод иммуноферментного анализа (ИФА), который даёт представление об общем пуле противовирусных антител, а также реакцию нейтрализации (РН), по результатам которой можно судить о защищённости человека от вируса. Защитным титром в ИФА считается 1:100, а в РН 1:10. Очевидно, что соотношение общего пула и нейтрализующих вирус антител может варьировать как при естественной иммунизации, так и после вакцинации.

В данной работе методами ИФА и РН были исследованы сыворотки крови жителей Свердловской области в возрасте от 1 года до 60 лет, собранные до иммунизации и через 30 дней после двух иммунизаций инактивированными вакцинами против клещевого энцефалита разных производителей. Введение препаратов осуществляли либо по стандартной схеме (интервал между иммунизациями 30 дней), либо по экстренной схеме (интервал 14 дней). Было показано, что данные о наличии противовирусных антител в защитных титрах, полученные по результатам ИФА и РН, совпадают более чем в 85% случаях. Расхождения между

Для корреспонденции: Карганова Галина Григорьевна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. Биологии арбовирусов ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва.
E-mail: karganova@bk.ru