

Генетические различия восточноевропейской и азиатской популяций вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа

Карань Л.С.¹, Погодина В.В.², Фролова Т.В.², Платонов А.Е.¹

Genetic diversity of East European and Asian strains of tick-borne encephalitis virus belonging to Siberian genotype

Karan L.S., Pogodina V.V., Frolova T.V., Platonov A.Ye.

¹ Центральная НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва

² Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва

© Карань Л.С., Погодина В.В., Фролова Т.В., Платонов А.Е.

Исследованы 40 штаммов вируса клещевого энцефалита, относящиеся к сибирскому генотипу. Анализ нуклеотидной последовательности участка гена *E* длиной 211 н.п. показал формирование двух кластеров. Один из них объединяет штаммы восточноевропейского топоварианта (ВЕ), другой — азиатского (А). В 234-м аминокислотном положении гена *E* у 17 из 20 исследованных штаммов ВЕ топоварианта находится гистидин (Н), у остальных трех — глутамин (Q) или тирозин (Y). Среди 20 штаммов азиатского топоварианта у 13 в позиции 234 присутствует гистидин (Н), у 7 — глутамин (Q).

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, сибирский генотип, восточноевропейская и азиатская популяции, секвенирование.

We have studied 40 strains of tick-borne encephalitis virus attributed to Siberian genotype. The fragment of *E* gene (211 nt) has been sequenced for all strains. Further analysis has evidenced the formation of two clusters. One of them includes the strains of East European (EE) origin, the other comprises the strains of Asian origin (A). 17 of 20 East European strains have histidin (H) in amino acid position 234 of gene E, the remaining 3 have either glutamine (Q) or tyrosine (Y). 13 Asian strains have histidine and 7 Asian strains have glutamine in amino acid position 234.

Key words: tick-borne encephalitis virus, Siberian genotype, East European and Asian populations, sequencing.

УДК 616.988.25–002.954.2

Введение

Вирус клещевого энцефалита (КЭ) имеет широкое географическое распространение, а вызываемое им заболевание отличается полиморфизмом клинических форм. В основном это выражается в разном соотношении клинических синдромов острого периода, а также в различной тяжести их течения, исходах острого периода, частоте развития прогрессивных форм [3]. Кроме того, частота встречаемости различных форм клещевого энцефалита зависит от географического расположения эпидемического очага.

Течение инфекционного процесса, безусловно, определяется как состоянием макроорганизма, так и свойствами самого вируса, заложенными в его геноме. В настоящее время выделяют три основных генотипа вируса клещевого энцефалита (дальневосточный, сибирский и европейский) и проводится большая работа по изучению генотипов, циркулирующих в разных

очагах КЭ. Но при накоплении данных по разным географически удаленным друг от друга очагам, где выявляется одинаковый генотип, можно внутри генотипа выявить подгруппы. Так, сибирский генотип вируса клещевого энцефалита отличается от дальневосточного и европейского наличием аминокислоты лейцин (L) в позиции 206 гена *E*. В позиции 234 гена *E* штаммы сибирского генотипа также имеют маркерные аминокислоты: гистидин (Н) или глутамин (Q), что делит их на две подгруппы [1, 2].

В данном исследовании были изучены штаммы и изоляты сибирского генотипа вируса КЭ (ВКЭ) с азиатской и восточноевропейской территории России с целью обнаружить факторы, способствующие этому разделению или являющиеся его следствием.

Материал и методы

В работе использована коллекция штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных Н.Г. Бочковой,

Л.С. Левиной, Г.В. Маленко, А.Г. Трухиной, В.В. Погиной, а также изоляты, полученные другими авторами [5, 6, 10]. Характеристика штаммов и их генотипирование описаны ранее [7—9]. Анализу нуклеотидной последовательности подвергали образцы вирусной РНК, изолированной непосредственно из клещей и аутопатов [8].

Вирусная РНК из штаммов, клинического и полевого материала выделялась с применением набора «Рибозоль-В» («Амплиценс», ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва). Нуклеотидная последовательность определялась на приборе «Applied Biosystem 3100 Genetic Analyser» с реактивами «Big Dye», версия 1.1 по инструкции производителя [7, 8].

Была определена нуклеотидная последовательность участка гена *E* длиной 211 н.п., включающая области двух вышеуказанных маркерных аминокислот, 32 штаммов и 8 изолятов ВКЭ сибирского подтипа. В дальнейшем проводился анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в программе Mega 2.1.

Результаты

В результате по маркерной аминокислоте в позиции 234 гена *E* исследованные образцы ВКЭ разделились следующим образом: 30 имели в 234-й позиции гена *E* гистидин (H), 8 — глутамин (Q), а 2 вологодских штамма образовали новую, ранее не описанную подгруппу, содержащую в 234-й позиции гена *E* тирозин (Y). При анализе таких характеристик изученных штаммов, как объект изоляции (при исследовании материала от больного учитывались форма и исход заболевания) и территория изоляции штамма, определенную закономерность для объединения штаммов по типу аминокислоты удалось установить только по географическому признаку.

Изученные штаммы и изоляты сибирского подтипа разделились на четыре подгруппы: две — для штаммов, выделенных на азиатской территории (азиатский топовариант), и две — для выделенных на восточноевропейской территории (восточноевропейский топовариант) (таблица).

1. Азиатская подгруппа H₂₃₄—Za (прототип — штамм «Zausaev»): 13 штаммов выделены в Томской, Кемеровской, Иркутской, Читинской, Свердловской областях, Красноярском и Приморском краях от боль-

ных острой формой КЭ с летальным исходом и хроническим КЭ и из клещей *I. persulcatus*.

2. Восточноевропейская подгруппа H₂₃₄—Yar (прототип — штамм «Yaroslavl-142»): 17 штаммов выделены в Ярославской, Вологодской, Ленинградской областях, Литве и Эстонии из *I. persulcatus*, *I. ricinus* и от больных острой формой КЭ с летальным исходом и без такового.

3. Азиатская подгруппа Q₂₃₄—Vs (прототип — штамм «Vasilchenko»): 7 штаммов выделены в Кемеровской, Иркутской, Новосибирской областях из *I. persulcatus*, от больных острым и хроническим КЭ.

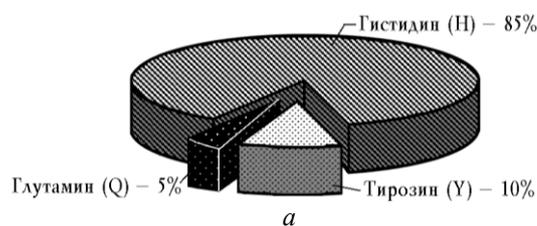
4. Восточноевропейская подгруппа Y₂₃₄—Vol: 2 вологодских штамма.

Распределение топовариантов сибирского генотипа в зависимости от аминокислоты в позиции 234 гена *E*

Аминокислота в позиции 234 гена <i>E</i>	Топоварианты	Обозначение варианта	Обозначение топоварианта и прототипный штамм
Гистидин (H)	Азиатский	1	H ₂₃₄ —Za («Zausaev», Томск)
	Восточно-европейский	2	H ₂₃₄ —Yar («Yaroslavl-142»)
Глутамин (Q)	Азиатский	3	Q ₂₃₄ —Vs («Vasilchenko», Новосибирск)
Тирозин (Y)	Восточно-европейский	4	Y ₂₃₄ —Vol («Vologda-658»)

Следует отметить, что штамм «Vologda-365» содержит в 234-й позиции аминокислоту глутамин и не внесен ни в одну подгруппу.

Таким образом, из 20 штаммов азиатской популяции гистидин выявлен у 13 штаммов (65%), а глутамин — у 7 (35%). А из 20 штаммов восточноевропейской популяции 17 имели гистидин (85%), 1 — глутамин (5%) и 2 штамма содержали тирозин (10%) в позиции 234 гена *E* (рис. 1).



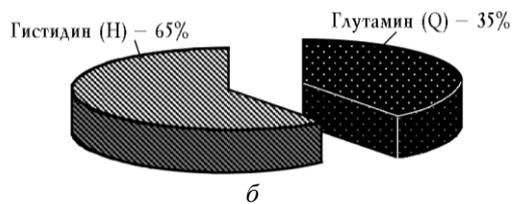


Рис. 1. Распределение изолятов ВКЭ в зависимости от аминокислоты в позиции 234 гена *E* в двух вирусных популяциях: восточноевропейской (а) и азиатской (б)

При построении дендрограммы на основе полученных авторами настоящей статьи нуклеотидных последовательностей образовались два кластера, один из которых представляет азиатский топовариант, другой — восточноевропейский. При этом необходимо отметить и некоторые исключения, характерные для обоих

кластеров. В группу азиатского топоварианта попадают и два вологодских штамма, имеющих маркерную аминокислоту тирозин. В группе восточноевропейского топоварианта оказался изолят «Ekaterinburg-42», выделенный из клещей *I. persulcatus* в 2003 г.

Отдельный кластер, включающий изоляты «Kemerovo-25» и «Litva-48», относящиеся к обоим изученным топовариантам, образуют самостоятельную ветвь на представленной дендрограмме. Штамм «Vologda-365», несмотря на имеющуюся в 234-й позиции аминокислоту глутамин, по нуклеотидной последовательности объединяется с восточноевропейским кластером (рис. 2).

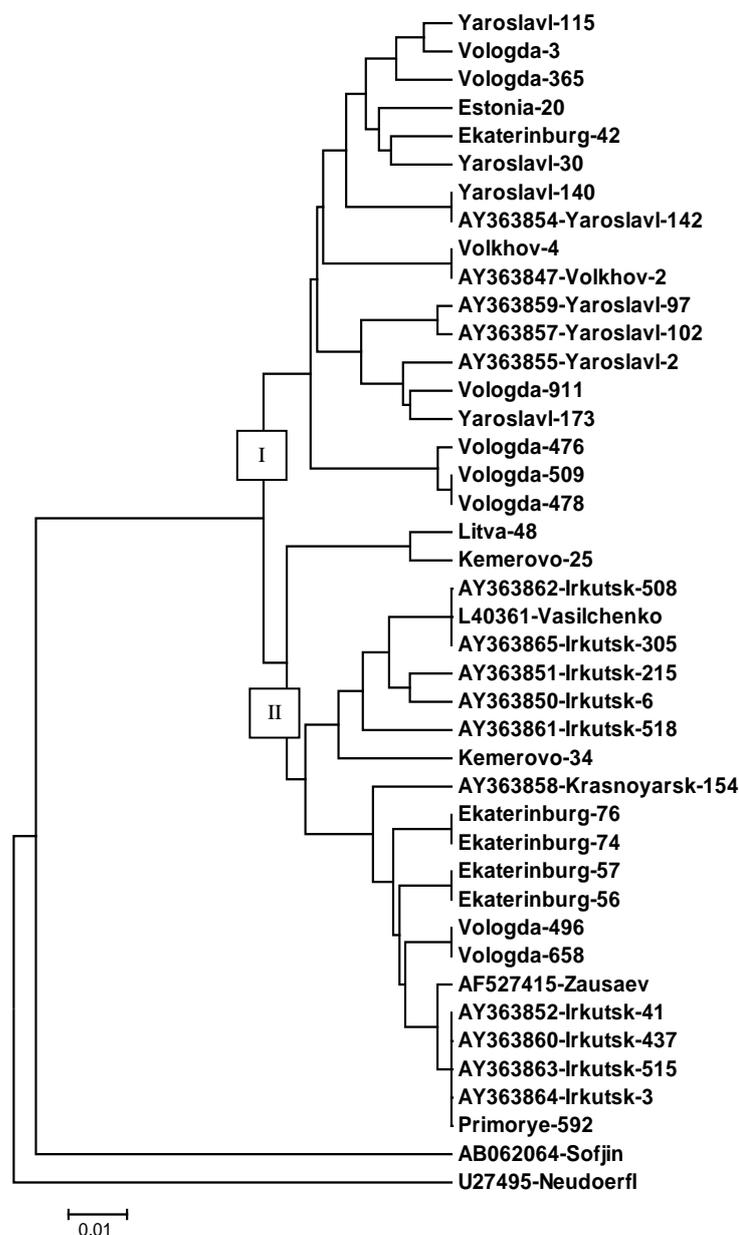


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая уровень генетического родства изолятов ВКЭ на участке гена *E* длиной 211 н.п. (построена по методу UPGMA с применением алгоритма пропорциональных расстояний): восточноевропейский (I) и азиатский (II) топоварианты

На основании полученных данных видно, что из изученных региональных вирусных популяций наиболее сложной по составу является вологодская популяция сибирского подтипа ВКЭ. Восточно-Европейская равнина является зоной совместного обитания *I. persulcatus* и *I. ricinus* и связанной с ними фауны млекопитающих [1, 2, 4]. Урал служит переходной территорией между европейской и азиатской частью России, что, возможно, и определяет гетерогенность

циркулирующих здесь штаммов ВКЭ, некоторые из которых близки к восточноевропейским («Ekaterinburg-42»).

Заключение

В представленной работе показана неоднородность популяции вируса клещевого энцефалита, относящаяся к сибирскому генотипу. Обнаруженные аминокислотные маркеры, позволяющие выделить гео-

графические топоварианты, являются устойчивыми в эволюционном плане (время выделения штаммов восточноевропейского топоварианта: 1943—2002 гг., азиатского топоварианта: 1961—2003 гг.). На данном этапе авторы смогли установить лишь связь данного маркера с территорией изоляции и отсутствие очевидной связи с источником изоляции (клещи или человек) или с формой и тяжестью заболевания. Безусловно, инвазивность, вирулентность вируса и его иммуногенность зависят от общего эффекта всех произошедших в его геноме мутаций.

В настоящее время авторами статьи проводится изучение полноразмерного гена *E* для указанных штаммов и изолятов. Сравниваются изоляты, полученные непосредственно из клещей и пассированные на культуре клеток или на животных для изучения процессов аттенуации. Разрабатываются методики анализа неструктурных генов ВКЭ. Возможно, новые полученные данные позволят ответить на вопрос о биологической значимости выявленных аминокислотных мутаций.

Литература

1. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мешаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии. Новосибирск: Наука, 2002. 438 с.
2. Злобин В.И., Беликов С.И., Джисоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Иркутск:

- РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. 272 с.
3. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Новосибирск: Гос. мед. академия МЗ РФ, 2001. 360 с.
4. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Районирование ареала вируса клещевого энцефалита. М., 1981. 148 с.
5. Краминская Н.Н., Живоляпина Р.Р., Мейерова Р.А. Опыт вирусологического изучения гиперкинетических форм клещевого энцефалита с прогрессивным течением // Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний. М., 1972. С. 224—225.
6. Левкович Е.Н. Вирусологические и иммунологические исследования вспышки энцефалита в Ленинградской области // Весенне-летний энцефалит в Ленинградской области. Л., 1945. С. 82—93.
7. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С. и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов // Вопр. вирусологии. 2004. № 4. С. 20—25.
8. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С. и др. Сравнительный анализ вирулентности сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита на основе экспериментальных и клинических данных // Вопр. вирусологии. 2004. № 6. С. 24—30.
9. Gritsun T.S., Venugopal K., Zanotto M. et al. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3' UTRs // Virus. Res. 1997. Vol. 49. P. 27—30.
10. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I. et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis // J. Virol. 2003. Vol. 7. P. 25—36.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.