
УДК: 616.831-002-022:578.833.2Flavivirus-036.2(571.1)

О РАСПРОСТРАНЕНИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И НА АЛТАЕ

В.В. Якименко¹, С.Е. Ткачев², М.Т. Макенов¹, М.Г. Малькова¹,
А.Ф. Любенко¹, С.А. Рудакова¹, Л.Д. Щучинова³, Ю.А. Петрова¹,
А.К. Танцев¹, А.Ю. Тикунов², Н.В. Тикунова²

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Омский
научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»
Роспотребнадзора, г. Омск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск

³Управление Роспотребнадзора в Республике Алтай, г. Горно-Алтайск

На основании молекулярно-генетического исследования 133 штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных в период с 1990 по 2014 гг. на Алтае, в Западной Сибири и Казахстане, показано широкое распространение европейского субтипа вируса КЭ в очагах горной и равнинной территории Алтая, равнинных степей региона.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, субтип, штамм, ПЦР

**SPREAD OF EUROPEAN SUBTYPE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS
IN WEST SIBERIA AND ALTAI**

V.V. Yakimenko¹, S.E. Tkachyov², M.T. Makenov¹, M.G. Mal'kova¹, A.F. Lyubenko¹,
S.A. Rudakova¹, L.D. Shyuchimova³, Yu.A. Petrova¹, A.K. Tantsev¹, A.Yu. Tikunov²,
N.V. Tikunova²

¹Omsk Research Institute of natural focal infections, Omsk

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk,

³Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being
surveillance of Altai Republic

Based on molecular genetic studies of 133 tick-borne encephalitis virus strains isolated from 1990 to 2014 in Altai, Western Siberia and Kazakhstan, the widespread of European subtype of tick-borne encephalitis virus in natural foci of mountain and plain areas of the Altai and steppe plains of the region was revealed.

Key words: tick-borne encephalitis, subtype, strain, PCR

Вопрос о политипичности вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) возник на фоне изучения биологических свойств штаммов вируса, изолированных из различных частей нозоареала возбудителя, в результате чего были выделены два субтипа вируса – западный и восточный. Прогресс в изучении гетерогенности состава возбудителей клещевого энцефалита (КЭ) был достигнут в 80-х гг. XX века с внедрением молекулярно-генетических методов [4, 12]. Применение метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК, [7]) позволило, во-первых, выделить три широко распространенных субтипа ВКЭ в РФ – европейского (Евр-ВКЭ, соответствовавшего второму субтипу ВКЭ по предшествовавшей – биологической классификации), дальневосточного (ДВ-ВКЭ – первый субтип) и сибирского (третий – новый субтип), а также показать наличие достаточно широкой вариабельности отдельных участков генома вируса КЭ в пределах отдельных субтипов [2]. В настоящее время различают, по крайней мере, пять субтипов ВКЭ: кроме уже известных дальневосточного, европейского и сибирского, в Прибайкалье описаны сравнительно недавно два новых субтипа (= генотипа) ВКЭ [1, 3].

В пределах Западной Сибири абсолютно доминирует сибирский субтип ВКЭ, представленный несколькими геновариантами: европейским, Васильченко, Заусаев, и четвертым, имеющим самостоятельный статус [11]. Европейский геновариант СибВКЭ в настоящее время восточнее Урала обнаружен в Курганской области [5].

Дальневосточный субтип присутствует в исследуемых выборках штаммов в Зауралье (Курганская обл., [8]), очагах КЭ в северной лесостепи Омской области (наши данные), на правом берегу Приобье [9, 10] и Кемеровской области [6].

Европейский субтип выявлялся только на Правобережном Приобье [10], что, вероятно, связано с особенностями распространения ВКЭ восточнее р. Обь. Ранее [2] вирус данного субтипа был обнаружен только в пределах Алтае-Саянской горной страны. Штаммы возбудителей, изолированные от иксодовых клещей (Змеиногорский р-н Алтайского края), показали высокий уровень гомологии (99% по гену E) со штаммами различного времени изоляции из Карелии, РФ (Абсеттаров), Финляндии и Эстонии [11].

Как известно, равнинная часть Западной Сибири характеризуется включением в состав местной флоры и фауны европейской компоненты, доля которой с запада на восток снижается. Это должно отражаться на особенностях структуры наземных биоценозов, в том числе – очаговых, и способствовать сохранению европейских форм возбудителей природно-очаговых инфекций. Однако практика многолетних исследований показывает ограниченность применения подобных подходов к микроорганизмам и вирусам. Целью данного исследования являлось изучение генотипического разнообразия ВКЭ в Западной Сибири и на Алтае, в частности, выяснение широты распространения европейского генотипа ВКЭ и поиск новых генотипов.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), изолированные от разных объектов из природных очагов клещевого энцефалита с территории Западной Сибири в её географических границах (включая северный Казахстан) и Алтая. В сообщении приводятся результаты, основанные на молекулярно-генетических исследованиях выборки из 133 штаммов ВКЭ, изолированных в период 1990 – 2014 гг. из источников, собранных на территориях Тюменской, Омской, Курганской и Новосибирской областей, Алтайского края и Республики Алтай.

Убежищных членистоногих из гнезд млекопитающих извлекали с помощью фототермозеклекторов, после чего формировали одновидовые пробы (не более 100 клещей в пробе) по принципу принадлежности одному гнезду. Уточнение систематического статуса членистоногих в пробе осуществляли с помощью световой микроскопии (микроскоп Axiostar plus, Zeiss) после изготовления тотальных

препаратов (использовали до 10% от числа особей в каждом пуле). Из исследуемого пула убежищных членистоногих готовили 10% суспензию для заражения.

Имаго пастбищных иксодовых клещей собирали при проведении маршрутных учетов численности на флаг. После сбора из клещей формировали пробы для хранения по критерию вида и пола и сохраняли до исследования в герметичных пробирках при температуре -196°C . Видовую принадлежность каждого клеща уточняли перед исследованием под бинокуляром («Micros», Austria) с максимальным увеличением до 50х в условиях стационарной лаборатории. Вирусологические исследования клещей осуществляли индивидуально, после предварительного скрининга с параллельным использованием ИФА тест-системы для выявления антигена вируса клещевого энцефалита (производство «Вектор-Бест», Новосибирск) и биопробы на микрокультуре клеток СПЭВ (на 96-луночных культуральных планшетах Corning) по критерию наличия-отсутствия цитопатического эффекта. Изоляцию вируса в биопробе на НБМ осуществляли из всех положительных образцов; использовалась суспензия концентрацией 5 или 10%.

Мелких млекопитающих отлавливали живоловками. Непосредственно перед вскрытием проводили эвтаназию диспозицией шейных позвонков. Пробы мозга в герметичных пробирках сохраняли до исследования при температуре -196°C . Для заражения беспородных белых мышей (НБМ) использовали 10% суспензию мозга.

Изоляцию вируса осуществляли в биопробе на новорожденных (2-3 суточных) НБМ путем интрацеребрального заражения исследуемой суспензией и последующим контролем за зараженными животными в течение трех недель с момента заражения. После первичного заражения осуществляли до двух последовательных пассажей (до стабилизации инкубационного периода).

Выделение суммарной РНК осуществляли с использованием набора «Рибозоль-100» (пр-ва Амплисенс, Москва) по протоколу фирмы-производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора «Реверта L» (пр-ва Амплисенс, Москва) по протоколу фирмы-производителя. Предварительно исследовали принадлежность полученных изолятов ВКЭ с использованием набора «АмплиСенс TBE-FL» для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», г. Москва), на амплификаторе Rotor-Gene 6000 по протоколу фирмы-производителя, с детекцией на каналах FAM, Green, JOE и Yellow. Положительные образцы исследованы в дифференцирующей три основных генотипа ВКЭ (дальневосточный, европейский и сибирский) тест-системе (ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией), любезно предоставленной Карань Л.С. (ФБУН НИЭ Роспотребнадзора, г. Москва), по рекомендуемому протоколу. Амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene 6000 по следующему режиму: hold : 95°C - 5 минут; cycling: 95°C - 20 секунд, 60°C - 50 секунд, 72°C - 20 секунд (50 циклов) с детекцией на каналах FAM и JOE. Полученные результаты выборочно подтверждали также в двухраундовой ПЦР с праймерами, соответствующими фрагментам гена E ВКЭ и специфическими или полиспецифическими разным генотипам ВКЭ. Затем секвенировали ряд полученных ПЦР-фрагментов на капиллярном секвенаторе ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) и проводили анализ полученных последовательностей длиной 673 п.н. (участок 978-1650 н.о. генома ВКЭ штамм Sofjin-Chumakov (KC806252)).

Результаты и обсуждение

Из 133 исследованных штаммов ВКЭ, полученных в ходе исследований, проводимых сотрудниками ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора в период 1990-2014 г.г. в Западной Сибири и на Алтае, для 19 штаммов (таблица 1) показано присутствие в образцах РНК вируса КЭ европейского субтипа (Евр-ВКЭ), из которых в восьми образцах зарегистрировано моноинфицирование. Штаммы Евр-ВКЭ изолированы от иксодовых клещей р. *Dermacentor* с территории Казахстана, приграничных с Казахстаном территорий Алтайского края (Угловский р-н), а также из органов мелких млекопитающих и птиц, и нидиколов их гнезд из среднегорий Алтая на приграничной с Республикой Тыва и Монголией территории. В последнем случае исследования проводились в безиксодовой зоне, на высотах выше 2200 м н.у.м., с 20-летним интервалом (соответственно, 1990-1991 и 2010 гг.).

Анализ расшифрованных последовательностей фрагмента гена E подтвердил, что исследуемые штаммы ВКЭ относятся к европейскому субтипу. При построении дендрограммы было показано, что штаммы ВКЭ европейского субтипа, выделенные на территории Западной и Восточной Сибири, формируют отдельные кластеры (рисунок 1). Исследуемая нами группа штаммов показала высокий уровень гомологии (99%) со штаммами ВКЭ, выделенными ранее на территории Алтая, а также ряда европейских стран (Швейцария, Финляндия, Республика Чехия и др.).

Кроме того, в результате исследований таежных клещей с территории Майминского района республики, проведенных сотрудниками Управления Роспотребнадзора в Республике Алтай в 2007 г. получено шесть штаммов ВКЭ, два из которых по результатам полноразмерного секвенирования генома полученных изолятов отнесены в европейскому субтипу (коды доступа в GeneBank и EMBL – Altay-103 JQ687275 и Altay-84.2 HM120875).

Таблица 1.

Результаты геновидовой идентификации и происхождение штаммов ВКЭ

№ штам- ма	Республика, Край	Область, район	Дата	Источник изоляции	Результат RT PCR - ВКЭ	Результат RT PCR- дифф. ВКЭ
12929	Республика Казахстан	Карагандинская обл.	Май 2001	<i>Dermacenton marginatus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12967	Республика Казахстан	Карагандинская обл.	Май 2001	<i>Dermacenton marginatus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
12691	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12693	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12695	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12984	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Alticola strelzovi</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12988	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
12682	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Август 2010	<i>Microtus rutilus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
12980	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Сентябрь 1990	<i>Alticola strelzovi</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
5970	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Сентябрь 1990	<i>Alticola macrotis</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ
5973	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Сентябрь 1990	<i>Oribatei fam. ge.sp. (Och- otona alpina)</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
5997	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Сентябрь 1990	<i>Alticola macrotis</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
№ штам- ма	Республика, Край	Область, район	Дата	Источник изоляции	Результат RT PCR - ВКЭ	Результат RT PCR- дифф. ВКЭ
5977	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Сентябрь 1990	<i>Microtus gregalis</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
5284	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Июль 1991	<i>Eulaelaps medius (Microtus gregalis)</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
6675	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Июль 1991	<i>Anthus spinoletta</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
5983	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Июль 1991	<i>Alticola strelzovi</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
6447	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Июль 1991	<i>Microtus oeconomus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
6466	Республика Алтай, РФ	Кош-Агачский район	Июль 1991	<i>Microtus oeconomus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*
12720	Алтайский Край, РФ	Угловский район	Апрель 2012	<i>Dermacenton marginatus</i>	ВКЭ	Евр-ВКЭ*

Примечание: * - микстовый вариант с другим субтипом ВКЭ

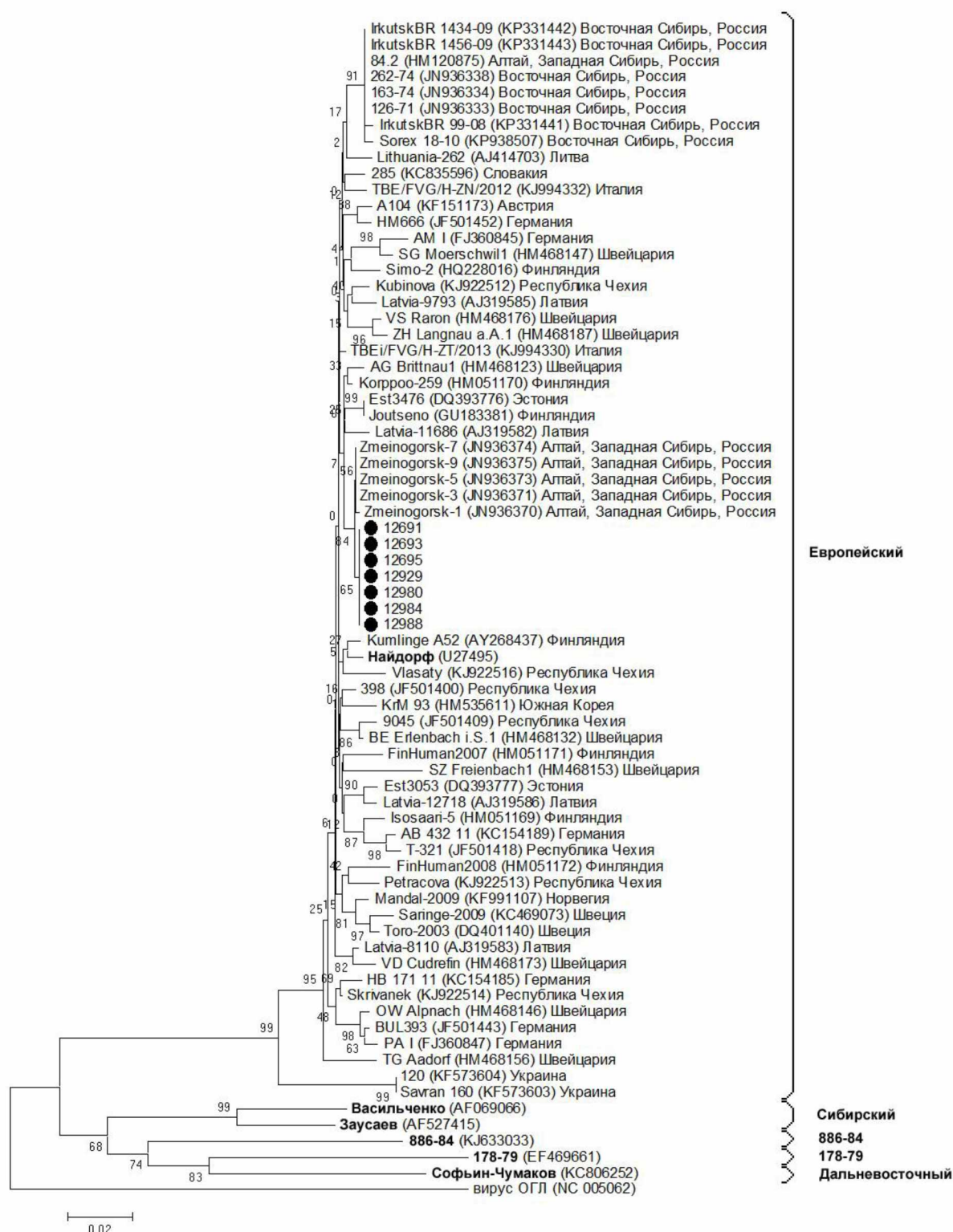


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная на основании последовательностей фрагмента гена E (позиции генома 978-1650 н.о.) методом ближайших соседей (neighbor-joining).

В узлах дендрограммы указаны индексы поддержки. Жирным выделены прототипные штаммы, соответствующие различным генотипам и субгенотипам ВКЭ. Справа указаны субтипы вируса. Черными кругами отмечены штаммы ВКЭ, исследованные в данной работе.

Обсуждение

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают наличие не территории региона эпизоотически активных очагов КЭ, ассоциированных с вирусом европейского субтипа, на территории Алтае- Саянской горной страны и степных территорий юга Западной Сибири и северного

Казахстана. Отдельный интерес вызывают природные очаги КЭ в безиксодовой зоне среднегорий Алтая, обеспечивающие длительное существование возбудителя КЭ в эпизоотическом цикле при участии нескольких видов Грызунов и Зайцеобразных (алтайская пищуха) и гематофагов из числа обитателей их гнезд, и некоторых видов наземно гнездящихся птиц. Гамазовые клещи и блохи из числа членистоногих убежищного комплекса являются единственными группами гематофагов на данной территории. Из летающих насекомых в фауне присутствуют представители группы слепней, численность которых крайне низка. Именно в этих условиях Евр-ВКЭ постоянно циркулирует (по крайней мере, на протяжении периода наблюдений), другие субтипы, видимо, элиминируются в случае заноса, что в данных условиях может быть реализовано только при участии птиц. По крайней мере, рекреационная нагрузка на данную территорию с 1990 по 2010 гг. только снижалась – выпас скота (с которым занос вируса потенциально возможен) в настоящее время практически отсутствует, что привело к полному восстановлению субальпийской растительности и лугов в долине реки. Кроме того, изучение спектра генотипов ВКЭ, циркулирующих в Чуйской степи при участии иксодовых клещей *D. nuttalli*, где интенсивность пастбищного животноводства высока, показывает циркуляцию ВКЭ нового или новых субтипов, отличных от уже известных пяти. В целом изменения структуры населения мелких млекопитающих и их эктопаразитов и нидиколов за период с 1990-1991 по 2010 гг. не отмечено. В степных ландшафтах циркуляция Евр-ВКЭ осуществляется при участии иксодовых клещей *D. marginatus*, сочетано с Сиб-ВКЭ или самостоятельно.

Следует отметить высокий уровень гомологии штаммов ВКЭ европейского субтипа, выделенных в разные годы на различных территориях, отдаленных географически. По всей видимости, штаммы европейского субтипа, по сравнению с представителями дальневосточного и сибирского субтипов характеризуются наиболее высокими уровнями гомологии как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей внутри одного генотипа, т.е. наименьшим уровнем различий [Demina et al., 2010; Yun et al., 2012]. Дальнейшие исследования геномов данных изолятов позволят оценить уровень эволюционной дистанции с изолятами вируса на Европейской части РФ и других государств, что позволит понять время формирования данных сибирско-алтайских группировок ВКЭ, а также получить информацию об условиях существования возбудителей разных субтипов в биоценозах разного типа и выявить возможные способы адаптации вирусов в очагах разного типа.

Выводы

1. На территории региона показано наличие и широкое распространение природных очагов КЭ, ассоциированных с Евр-ВКЭ.
2. ВКЭ европейского субтипа имеет достаточно широкое распространение в пределах Алтае-Саянской горной страны и равнинных степей юга Западной Сибири и северного Казахстана в условиях очаговых экосистем, значительно отличающихся от территории нозоареала Евр-ВКЭ.
3. Эпизоотически активные очаги Евр-ВКЭ могут существовать без участия иксодовых клещей с пастбищным или убежищным типом паразитизма.

Литература

1. Верховина М.М., Козлова И.В., Демина Т.В., Джигоев Ю.П. Молекулярно-эпидемиологическая и эколого-географическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири // В кн.: Инфекции, передаваемые иксодовыми клещами в Сибирском регионе. - Новосибирск, СО РАН. - Вып. 30. - 2011. - С. 84 – 107.
2. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии. - Новосибирск: Наука, 2002. - ISBN 5-02-032021-8. - Тир. 500. - 438 с.
3. Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М. и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования // Вопросы вирусологии. - 2012. - №4. - С. 12 – 19.
4. Дрокин Д.А. Индикация и идентификация флавивирусов методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот: Автореф..... дисс. канд. биол. наук., Томск, 1993. – 19 с.
5. Карань Л.С., Погодина В.В., Колясникова Н.М., Левина Л.С. и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. 2. Генетические кластеры // Медицинская вирусология: Материалы научной конференции с международным участием. - М., 2013. - Т. XXVII (1). - С. 87.
6. Колясникова Н.М., Карань Л.С., Погодина В.В., Левина Л.С. и др. Мониторинг структуры популяций вируса клещевого энцефалита в Уральском, Западно-Сибирском и Северо-Западном регионах России // Медицинская вирусология: Материалы научно-практической конференции. - М., 2009. - Т. XXVI. - С. 93 - 94.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии // Гл. 7. Молекулярное клонирование. (ред. Бабаев А.А., Скрябин К.Г.). - М.: Мир, 1984. - С. 205 – 240.
8. Погодина В. В., Карань Л. С., Колясникова Н. М., Герасимов С. Г. и др. Эволюция клещевого

энцефалита и проблемы эволюции возбудителя // Вопросы вирусологии. – 2007. - №5. – С. 16-21.

9. Ткачев С.Е., Казакова Ю.В., Черноусова Н.Я., Толоконская Н.П. Молекулярно-генетический анализ вариантов ВКЭ, выявленных у пациентов Новосибирской области // Национальные приоритеты России. – 2009. - №2. - С. 174 – 175.

10. Ткачев С.Е., Боргояков В.Ю., Чикова Е.Д., Панов В.В. Генетическое разнообразие ВКЭ на территории Новосибирского НЦ // Национальные приоритеты России. – 2011. - №2 (5). - С. 154 – 155.

11. Ткачев С.Е., Козлова И.В., Джигоев Ю.П., Верховина М.М. и др. Характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита европейского генотипа, выявленных на территории западной и восточной Сибири // Национальные приоритеты России. – 2014. - № 3(13). - С. 127 – 130.

12. Шаманин В.А., Плетнев А.Г., Дрокин Д.А., Злобин В.И. Применение молекулярной гибридизации с синтетическими дезоксиолигонуклеотидами для дифференциации штаммов вируса клещевого энцефалита.– Иркутск, 1990. – С.15 - 16.

13. Demina T.V., Dzhiyev Yu.P., Verkhovina M.M., Kozlova I.V., et.al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // Journal of Medical Virology. - 2010. - V. 82. - P. 965–976.

14. Yun SM, Song BG, Choi W, Park WI, et.al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks collected from the republic of Korea during 2011-2012 // Osong Public Health Res Perspect. - 2012. - V. 3. - №4. - P. 213-221.

Сведения об авторах

Якименко В.В. – докт. биол. наук, заведующий лабораторией арбовирусных инфекций отдела природно-очаговых вирусных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, E-mail: yakimenko@oniipi.org

Макенов М.Т. – канд. биол. наук, старший научн. сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций отдела природно-очаговых вирусных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, E-mail: makenov@oniipi.org

Василенко А.Г. – младший научн. сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций отдела природно-очаговых вирусных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»