

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ГЕНОТИПА, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮГА РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

А.Л. Шутикова, В.А. Лубова, О.В. Иунихина, А.Б. Потт, М.Ю. Щелканов
НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

Многочисленные исследования вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) на протяжении последних 80 лет позволили установить существенное внутривидовое генетическое разнообразие ВКЭ, которое увеличивается по мере нарастания объемов исследованных штаммов. Накопленный к настоящему времени массив информации о генетическом разнообразии ВКЭ требует продолжения изучения его генетической структуры и биологических механизмов, которые обеспечивают как формирование новых вариантов вирусов, так и стабилизацию естественной циркуляции их в природе.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, дальневосточный генотип, генетические свойства, Приморский край.

MOLECULAR AND GENETIC PROPERTIES OF FAR EASTERN GENOTYPE OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED IN THE SOUTH OF THE RUSSIAN FAR EAST

A.L. Shutikova, V.A. Lubova, O.V. Iunikhina, A.B. Pott, M.Yu. Shchelkanov
G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia

Numerous studies of tick-borne encephalitis virus (TBEV) over the past 80 years have established significant intraspecific genetic diversity of TBEV, which increases as the volume of strains studied increases. The amount of information accumulated to date on the genetic diversity of TBEV requires continued study of its genetic structure and biological mechanisms that ensure both the formation of new virus variants and the stabilization of their natural circulation in nature.

Key words: tick-borne encephalitis virus, Far Eastern genotype, genetic properties, Primorsky krai.

Клещевой энцефалит (КЭ) остаётся актуальной инфекцией для юга российского Дальнего Востока [4, 15], где функционируют активные природные очаги [8, 9] вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*) [7]. Это смертельно опасное для человека заболевание проявляется лихорадкой, интоксикацией и поражением центральной нервной системы [5]. В последние годы в структуре заболеваемости КЭ очаговые формы болезни стали встречаться редко, в основном преобладают лихорадочные [3]. Данное явление может быть связано с изменением как геномной, так и популяционной структуры ВКЭ.

Основным механизмом генетической изменчивости флавивирусов считается процесс накопления в геноме точечных нуклеотидных замен. Для РНК-содержащих вирусов характерна высокая частота спонтанных мутаций 10^{-4} - 10^{-5} замен на сайт на цикл репликации [13]. Для понимания механизмов распространения и поддержания природных очагов ВКЭ дальневосточного генотипа (ВКЭ-ДВ) необходимо изучение генетической изменчивости штаммов этого вируса.

Материалом для исследования послужили кодирующие полногеномные структуры (~ 10200 н.п.) 22 штаммов ВКЭ-ДВ из коллекции вирусов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (Primorye-20n, Primorye-28, Primorye-37m, Primorye-119, Primorye-124, Primorye-135, Primorye-336, Primorye-344, Primorye-371, Primorye-374-99, Primorye-458, Primorye-467, Spassk-472, Primorye-635, Primorye-651, Primorye-653, Primorye-814, Primorye-2212, Primorye-2701, Primorye-4152, Primorye-4202, Primorye-270-99) [2]. Данные штаммы ранее

были нами депонированы в базу данных VGARus. Матрица аминокислотных замен построена с помощью программы Mega v.7.0.

C (112 a.o.) PrM	PrM (168 a.o.)	E (496 a.o.)	NS1 (352 a.o.)	NS2a (230 a.o.)
1111111222	11	1111111	2223333444444	11111122
1234584666678122	235666899901	356 3344555	664691346023367	300245708
1493239468905558	420149478901	1994 4916579	376097023791639	489713587
Sofjin-1953	KQIAKKTAAVDLVAQAMAAAVVANAHMIVVIRFTAVSYKKISVSDTIASLKAEQLIVQIVIR			
P-814	..VS...S....	...VIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...G..TAH....
P-653	..VS...S....	...VIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...G..TAH....
P-119	..VS...S....	...VIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...G..TAH....
P-2701	..VS...S....	M.PVIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...G..TAH....
P-28	..VS...S....	...VIVVT...	.D.Q...T..AS.G	..GV.I.EI .VG...G..TAH....
P-467	I ..VS...S....	M.PVIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...G..T.H....
P-651	..VS...S....	...VIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG.R.G...H....
P-4202	..VS...S....	...PVIVVT...	.D.Q...T..A..G	..GV.I.EI .VG...MA.H....
P-20-n	..VS...S.E..	...PVIVVT..M	.D.QL.I.TK.A..G	..GV.I.EI .VG...TAH....
P-336	..VS...S....	...VIV.T.L.	.D.Q...T..A..G	..GV...E. .VG...T.H.I..
P-124	..VS...S....	...VVV.T...	.D.Q...T.....	..GV..... .VG...T.H..V.
P-135	..VS...S....	...VVV.T...	.D.Q...T.....	..GV..... .VG...R.T.H..V.
P-458	II ..VS...S.L..	...VVV.T...	.D.Q...T.....	..GV..... .VG...T.H..V.
P-371	..VS...SS....	...VVV.T...	.D.Q...T.....	..GV..... .VG...S...TAH..V.
P-2232	..VS...SS....	..PVVV.T...	.D.Q...T.....	..RGV..... .VG...S...TAH..V.
P-344	III .RVSNR.S.NN-	..VPVVV.TV..	.D.Q...T..L..A.	F.GVD.... .VG.R....H....
P-37m	..RVSNR.S.NN-	..VPVVV.TV..	VD.Q...T..L..A.	F.GVG.... .VG.R....AH....
P-2212	..RVSNR.S.NN-	...VVV.TV..	.D.Q...T...A.	..GVG.... .VG.R....AH....
P-270-99	IV .RVSNR.S.IN-	...VVV.TV..	.DVQ...T...A.	..GVG.... .VG.R....AH....
P-374-99	..RVSNR.S.IN-	..PVVV.TV..	.DVQ...T...A.	..GVG.... .VG.R....H....
P-4152	..RVSNR.S.IN-	..PVVV.TV..	.DVQ...T...A.	..GVG.... .VG.R....AH....
P-635	V .RVSSR.S..V	...VIV.TV..	.D.Q.T.T...A.	..GVG.P.. VVGF.R....AHV..K
Spassk-472	RRVSNR.ST..V	...VIV.TV..	.D.Q.T.AT...A.	..GVG.P.. .VGF.R....HV..K
NS2bNS3 (621 a.o.)NS4aNS4b (252 a.o.)NS5 (903 a.o.)				
(131 a.o.)(149 a.o.)				
	1	12233455	1	111122
	0	14686737656	24892	1249034701
	8	65241596783	41122	5805011953
				1245555566678888
Sofjin-1953	FRSYISRSIQSSMKTAATESMVELVAAKIRMYAHTEKISGIAADAK			
P-814	.	..S.....N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-653	.	..S.....N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-119	.	..S...F...N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-2701	.	..S.....N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-28	.	..S...V...N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-467	I .	..S...F...N	..M.. .KF...F...	...V.....R..S...
P-651	.	..S.....N	..M.. .K...F...	...V.....R..S...
P-4202	.	..S.....N	..M.. .KF...F...	...VH...K...R...R
P-20-n	.	..S.....N	..M.. A...F...	..V.V.....R.....
P-336	.	..S.....N	..M.. .KF...F...	...V.....R.....
P-124	.	..ST.....N	..M.. .KF...F...	R.KV.VY....R.....
P-135	.	..ST.....N	..M.. .KF...F...	R.KV.VY....R.....
P-458	II .	..ST...R.N	..M.. .KF...F...	..KV.Y....R.....
P-371	.	..ST.....N	..M.. .KF...F...	..KV.VY....K.....
P-2232	.	..ST.....N	..M.. .KF...F...	..KV.VY....K.....
P-344	III VKFS.A.....N	..RM.. .K.V..FA.V	...V.VYI.R.TKVS.N..	
P-37m	VKFS.A...A.N	..RM.. .V.DFA.V	...V..YI.R.TKVS.N..	
P-2212	VKFS.A.....N	..M.. .V..FA.V	...V..Y....TKVS..T.	
P-270-99	IV VKFS.A.....N	..M.. .K.V..FA.V	...V.VY....TKVS..T.	
P-374-99	VKFS.A.....N	..M.. .K.V..FA.V	...V.VY....TKVS..T.	
P-4152	VKFS.A.....N	..M.. .K.V..FA.V	...V.VY....TKVS..T.	
P-635	V .KFS.A....GNI.MVV	..K..A.F.TV	...V..Y....VTKVS..V.	
Spassk-472	.KFS.AP...GN	..M.V	..K....F..V	...V..Y....VTKVS..V.

Рис.1. Варибельные сайты кодирующей части полного генома штаммов ВКЭ-ДВ. Показаны специфичные для групп аминокислотные замены

Идентичность изученных штаммов на территории Приморского края по нуклеотидным и

аминокислотным последовательностям в среднем составила 90,3% и 96,8%, соответственно. Оказалось, что полученные последовательности содержат большое количество полиморфизмов. Значительная часть мутаций распределена по всему полипротеину. Матрица аминокислотных замен, представленная на рис. 1, позволила выделить характерные замены для разных групп штаммов.

Различия между штаммами обусловлены наличием нуклеотидных замен (синонимичных и не синонимичных) и делеций. Для полной выборки выявлено 1712 полиморфных сайтов, из них сайтов с транзициями – 1565, с трансверсиями – 224. Не синонимичные замены нуклеотидов привели к изменению аминокислотной последовательности в 109 позициях.

В группе анализируемых нами штаммов мутации в белке С (в позициях 99, 100 и 111) расположены с С-концевой части белка (трансмембранный домен белка С), в области сигнального пептида, который определяет связывание с внутриклеточной мембраной и вирусной протеазой NS2b-NS3 в процессе созревании белка С и расщепления связи между белком С и ргМ [14]. Теоретически мутации в этой области могут повлиять как на сродство вируса к мембране, так и на скорость отщепления ргМ, что может приводить к изменению скорости накопления вируса в клетках мозга и таким образом менять его вирулентность. Белок ргМ/М является предшественником белка М, который имеет молекулярную массу около 8 кДа (75 а.о.), участвует в образовании созревающих вирусных частиц, связанных с клеточной стенкой [6]. В группе анализируемых нами штаммов мутации в ргМ расположены далеко от места расщепления белка ргМ протеазами (SRTRR↓SVLIP) и, вероятно, мало влияют на вирулентность штаммов.

Поверхностный гликопротеин Е является основным структурным мембранным белком ВКЭ, который опосредует связывание вириона с клеточными рецепторами, определяет тропизм, вирулентность и обеспечивает образование вируснейтрализующих антител [7, 17]. Центральный домен, или домен I, включает 1-51, 137-189, 285-302 а.о., формирующие структуру β-слоя. Домен I образует антигенный сайт С [16]. В этом домене в позиции 285-302 а.о. у штамма Р-20п имеется замена М299L. В домене II в антигенном сайте А (52-136 а.о.) у всех исследуемых штаммов обнаружена замена N67D, а у штамма Р-37m – А63V. Считается, что этот домен определяет гемагглютинирующую активность вируса. Домен III образует антигенный сайт В (303-395 а.о.) [16]. В данном домене у всех исследуемых штаммов отмечена замена I363T, у Р-635, Spassk-472 – I317T, у Р-20п – V330I, у Spassk-472 – V342A. Этот домен участвует в формировании димерного контакта, образуя тройственный контакт с доменом II второй молекулы, входящей в состав димера, и доменом I собственной молекулы. Домен III участвует в связывании со специфическим рецептором [11].

Отмечена замена N67D у всех исследуемых штаммов в рецепторной области между 53-86 а.о. Данная область обеспечивает взаимодействие с ламинин-связывающим белком клетки, который является клеточным рецептором/корцептором для ВКЭ [1]. В данном белке содержатся две специфические замены для штаммов из группы I: T431A и S479G.

Белок NS1 имеет две замены: S141D у штамма Р-344 и S141G у нескольких штаммов. Данная замена находится близко к четвертому консервативному остатку цистеина в позиции 144, который вовлечен в процесс олигомеризации данного белка. Возможно, неконсервативная замена способна повлиять на структуру и функции этого белка. Отмечена замена в позиции 153 у штаммов, относящихся к группе I. Замена S175P является специфичной для группы V, а D208E специфична для группы I.

В белке NS2a находятся 4 специфичные для разных групп штаммов мутации. Для группы II мутация находится в положении I225V. Три мутации характерны для группы V: L43F, I185V, R228K.

Наличие всего одной замены F108V 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. 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 [12]. Поэтому любые изменения в аминокислотной последовательности белка NS2b с большой вероятностью приведут к изменению сайта связывания с NS3 и потере протеазной активности.

В позициях 184 и 558 белка NS3 находятся специфичные замены для группы II и V. Замены в позициях 16 и 45 располагаются в последовательности, образующей каталитический домен вирусной протеазы NS2b-NS3. Данный фермент осуществляет процессинг вирусного полипротеина. Наибольший интерес представляет замена S45F, которая находится возле консервативного участка (46–60 а.о.), окружающего остаток гистидина, входящего в активный центр этого фермента. Возможно, эта замена способна повлиять на активность протеазы NS2b-NS3. По мнению С.И. Беликова с соавт. (2014) лизин в позиции 16 и фенилаланин в позиции 45 вирусной протеазы NS3 способствуют уменьшению патогенности штаммов ВКЭ-ДВ [10].

В белке NS4b присутствует замена M95V у ряда штаммов и V100A у штамма P-635, оказывающие влияние на вирулентность штаммов, так как ранее было показано, что замены в пределах центрального региона белка NS4b (95–114 а.о.) приводят к снижению вирулентности флавивирусов.

Замены белка NS5 в позициях 692 и 724 находятся в последовательности, формирующей вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу. Замена I692V расположена близко к каталитическому центру фермента и, возможно, способна повлиять на его активность. Замена A724S находится внутри консервативного мотива белка E, который участвует в формировании пространственной структуры фермента за счет гидрофобных связей с другими аминокислотными остатками. Замена гидрофобного остатка аланина на гидрофильный остаток серина, вероятно, может оказать влияние на структуру и функциональную активность вирусной РНК-полимеразы.

Структура распределения попарных генетических различий указывает на генетическую гетерогенность исследуемых штаммов ВКЭ внутри дальневосточной популяции. Проведенный анализ показал, что некоторые группоспецифичные мутации находятся в функционально значимых участках вирусных белков, мутации в которых, как экспериментально показано ранее, влияют на вирулентность различных флавивирусов и в том числе ВКЭ. Поэтому с высокой долей вероятности можно сказать, что эти мутации могут быть причиной различной вирулентности исследуемых штаммов. Возможно также, что различная вирулентность штаммов является результатом совместного влияния нескольких аминокислотных мутаций в геноме ВКЭ.

Литература

1. Богачек М.В., Протопопова Е.В., Терновой В.А. и др. Иммунохимические свойства рекомбинантных полипептидов, моделирующих домены I и II белка E вируса Западного Нила // Молекулярная биология. – 2005. – Т.39, №5. – С.813-822.
2. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Калинин А.В. и др. 80 лет на страже биологической безопасности у восточных рубежей России // Здоровье населения и среда обитания. – 2021. - №5. – С.5-15.
3. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т.97, №2. – С.150-158.
4. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А. и др. Атлас распространения возбудителей природноочаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: Изд-во НПЦ ТМГ МЗ РФ. – 2001. - 192 с.
5. Медицинская вирусология / Ред.: Д.К. Львов. М.: МИА. – 2008. - 655 с.
6. Пономарева Е.П. Вирус клещевого энцефалита в региональных природных очагах и его изменчивость при адаптации к новому хозяину // Дис. ... канд. мед.наук. Новосибирск: ГНЦ ВБ «Вектор». – 2022. - 155 с.
7. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Ред.: Д.К. Львов. М.: МИА. – 2013. - 1200 с.
8. Щелканов М.Ю., Аристова В.А., Чумаков В.М., Львов Д.К. Историография термина «природный очаг» // В сб.: Новые и возвращающиеся инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации. Учебно-методическое пособие. М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. - 2014. – С.21-32.
9. Щелканов М.Ю., Леонова Г.Н., Галкина И.В., Андрюков Б.Г. У истоков концепции природной очаговости // Здоровье населения и среда обитания.- 2021. -№5. –С.16-25.
10. 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. - N 9: e94946.
11. Bhardwaj S., Holbrook M., Shope R., et al. Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein // J. Virol. – 2001. - N8.- P.4002-4007.
12. 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. – V. 67, N11. – P.6797-6807.
13. Dolan P.T., Whitfield Z.J., Andino R. Mechanisms and Concepts in RNA Virus Population Dynamics and Evolution // Ann. Rev. - Virol. – 2018. – V.5, N1. –P.69-92.
14. Kiermayer S., Kofler R.M., Mandl C.W., et al. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles // J. Virol. – 2004. – N.78. –P. 8078-8084.
15. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. Academic Press. – 2015. -452 p.

16. Mandl C.W., Heinz F.X., Stöckl E., Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses // *Virology*. – 1989. – V.173, N.1. – P. 291-301.

17. Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins // *Adv. VirusRes.* – 2003. – N.59. – P. 141-175.

Сведения об ответственном авторе:

Шутикова Анна Леонидовна – старший научный сотрудник лаборатории зоонозных вирусных инфекций ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; тел.: +7 (914) 693-9928; e-mail: shutikova79@mail.ru.

УДК:619:595.421Ixodidae:001.8(571.63

DOI: 10.62963/2073-2899-2024-47-56-59

МОНИТОРИНГ ВИДОВОГО СОСТАВА ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ И ИХ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Ю.В. Нестерова, Е.В. Жебровская, А.А. Симонова

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», Владивосток, Российская Федерация

На территории Приморского края локализуются природные очаги клещевых трансмиссивных инфекций. Благодаря оптимальным природно-климатическим условиям на территории края поддерживается высокая численность переносчиков и их прокормителей, что создает возможность для циркуляции возбудителей и способствует формированию и функционированию известных и широко распространенных природных очагов инфекций, передающихся клещами - клещевых боррелиозов, клещевого риккетсиоза моноцитарного эрлихиоза человека, гранулоцитарного анаплазмоза человека.

Ключевые слова: эпизоотологические исследования, иксодовые клещи, видовой состав, природный биотоп, динамика численности.

MONITORING OF THE SPECIES COMPOSITION OF IXODIC TICKS AND THEIR EPIZOOTOLOGICAL SIGNIFICANCE IN THE TERRITORY OF PRIMORSKY KRAI

Y. V. Nesterova, E.V. Zhebrovskaya, A.A.Simonova

Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia

The territory of Primorsky Krai is a natural hotbed of tick-borne infections. Due to optimal natural and environmental conditions, a high number of vectors and feeders are maintained in the territory of the region, which creates an opportunity for the circulation of pathogens and contributes to the formation and functioning of well-known and widespread natural foci of infections transmitted by ticks, tick-borne borreliosis, Siberian tick-borne typhus, human monocytic ehrlichiosis, human granulocytic anaplasmosis.

Keywords: epizootological studies, ixodic mites, species composition, natural biotope, population dynamics.

Приморский край является эндемичным регионом относительно разных трансмиссивных клещевых инфекций (КТИ) [1,2]. По официальным данным, ежегодно в медицинские организации края по поводу присасывания клещей обращаются от 6000 до 8500 человек.

Известно, что клещи являются переносчиками целого ряда болезней человека вирусной, бактериальной и протозоозной природы [3].

На территории Приморского края официально регистрируются клещевой энцефалит, болезнь Лайма (клещевой боррелиоз), Сибирский клещевой тиф, моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ).

В структуре клещевых инфекций в 2023 г., как и в предыдущие годы (за исключением 2020 г.), преобладал клещевой риккетсиоз – 52,1%. На втором ранговом месте находилась бо-