

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ КОЛЛЕКЦИИ НИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ Г.П. СОМОВА РОСПОТРЕБНАДЗОРА

А.Л. Шутикова, В.А. Лубова, М.Ю. Щелканов

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

GENETIC CHARACTERISTICS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS STRAINS OBTAINED FROM COLLECTION OF G.P. SOMOV SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF EPIDEMIOLOGY AND MICROBIOLOGY OF THE FEDERAL SERVICE FOR SURVEILLANCE ON CONSUMERS RIGHTS PROTECTION AND HUMAN WELLBEING (ROSPOTREBNADZOR)

A.L. Shutikova, V.A. Lubova, M.Yu. Shchelkanov

G.P. Somov Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Vladivostok, Russia

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (Amarillovirales: Flaviviridae, *Orthoflavivirus*) [1, 2] является этиологическим агентом клещевого энцефалита (КЭ), имеющим природно-очаговую природу [3-5].

Вирион ВКЭ оболочечный, имеет сферическую форму диаметром 45-60 нм, его геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, состоящей приблизительно из 11 тыс. нуклеотидов и имеющий кэп-структуру на 5'-конце, которая защищает вирусный геном от деградации и необходима для инициации трансляции [1, 2, 6]. В геноме закодирован протяжённый полипротеин-предшественник, который во время посттрансляционной модификации разрезается клеточными и вирусными протеазами на 10 белков. На N-конце полипротеина расположены структурные белки С, М (точнее рМ, из которого позже вырезается М) и Е, входящие в состав вириона; далее находятся неструктурные белки вируса: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A и NS5, обеспечивающие репликацию вируса в инфицированной клетке [1, 2, 7].

Наиболее значимым белком вириона является поверхностный белок Е, который играет основную роль в процессах сборки и созревания вириона, его проникновения в клетку-мишень, а также содержит нейтрализующие эпитопы [1, 2, 8]. Определение его нуклеотидной последовательности является незаменимой основой как для изучения известных в настоящее время видов вирусов, так и для идентификации и характеристики новых вирусов.

В Приморском крае КЭ занимает важное место в структуре заболеваемости населения по тяжести течения и показателям летальности. Заболеваемость клещевым энцефалитом характеризуется периодическими подъемами и спадами, неравномерно распределяясь по территории края, что связано с природно-экологическими особенностями Приморья, определяющими существование природных очагов ВКЭ и закономерности их формирования и функционирования [2, 9, 10].

Целью данного исследования было изучение генетической характеристики штаммов вируса клещевого энцефалита из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора. Для этого из коллекции вирусов были получены 23 штамма: Primorye-4202, Primorye-4195, Primorye-4152, Primorye-124, Primorye-814, Primorye-L270-99, Primorye-653, Primorye-651, Primorye-635, Primorye-467, Primorye-458, Primorye-37m, Primorye-374-99, Primorye-371, Primorye-344, Primorye-336, Primorye-28, Primorye-2701, Primorye-2232, Primorye-135, Primorye-119, Primorye-20n, Primorye-2212. Все штаммы были в различные годы изолированы на территории Приморского края [11-13]. РНК ВКЭ выделяли из 10 % суспензии мозга интрацеребрально-инокулированных новорождённых беспородных мышей с использованием коммерческого набора реагентов РНК/ДНК «РИ-БО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, РФ), кДНК получали при помощи набора «Реверта-Л» (ЦНИИ эпидемиологии, РФ). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с «горячим стартом» проводили с использованием коммерческого набора БиоМастер HS-Taq ПЦР (Биолабмикс, РФ). Анализ полученных ПЦР-продуктов проводили методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Секвенирование гена Е ВКЭ осуществляли методом Сэнгера на капиллярном автоматическом секвенаторе H1616 (Nanjing Superyears Gene Technology, КНР). Анализ хроматограмм, выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей и поиск гомологий с референсными штаммами использовали программу Mega v.7.0 (PSU, США). Для построения филогенетического дерева использовали метод «ближайшего

соседа» (Neighbor-joining algorithm). Верификацию достоверности филограмм осуществляли с помощью бутстрэп-анализа с 1000-ными повторами.

В результате были получены ампликоны нуклеотидных последовательностей гена Е ВКЭ длиной 1488 пар нуклеотидов. Для сравнительного анализа и построения более заполненного филогенетического дерева из международной базы генетических данных GenBank были взяты нуклеотидные последовательности 38 штаммов, изолированных на юге российского Дальнего Востока и депонированных ранее, в том числе – прототипных штаммов дальневосточного генотипа ВКЭ (Sofjin-1953 [KU761576], Senzhang [JQ650523], Oshima 5–10 [AB062063]). В качестве аутгруппы выбран штамм Aina [JN003206] ВКЭ сибирского генотипа, выделенный в 1963 г. в Иркутской области. Построенное филогенетическое дерево показало, что все исследованные образцы относятся к дальневосточному генотипу ВКЭ, распространенному на территории Приморского края. Дальнейший анализ дендрограмм выявил высокий уровень гомологии 7 штаммов с прототипным штаммом Oshima, 14 – с прототипным штаммом Sofjin-1953, 2 – с прототипным штаммом Senzhang.

Наиболее значительную, но неоднородную группу составили штаммы, вошедшие в группу Sofjin-подобных. В свою очередь штаммы Primorye-458, Primorye-135, Primorye-371, Primorye-653, Primorye-28, Primorye-814, Primorye-2701, Primorye-119, Primorye-467 сгруппировались на дереве на двух близлежащих ветвях. Эти штаммы в большинстве выделены из иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodidae) рода *Ixodes* в 1980-1990-х гг.. Кроме того, 6 штаммов оказались близкородственными штамму Dalnegorsk, выделенному в 1972 г. из мозга умершего человека с очаговой формой КЭ. Штамм Primorye-20n изолированный нами в 2023 г. из мозга умершего человека, и Primorye-651 сформировали отдельные ветви. Штамм Primorye-336, выделенный в 1991 г. из крови больного КЭ, филогенетически близок к штамму Primorye-92, изолированному в 1992 г. из мозговой ткани умершего человека.

Более однородной оказалась группа Oshima-подобных штаммов. На филогенетическом дереве можно выделить две самостоятельные ветви с высокой статистической достоверностью. Одна состоит из двух штаммов: Primorye-69 (изолирован в 2000 г. из крови пациента) и Primorye-635 (изолирован в 1978 г. из *I. persulcatus*). Вторую ветвь сформировали все остальные штаммы.

В группу Senzhang-подобных штаммов вошли штаммы Primorye-2232 и Primorye-2212, которые сформировали отдельную подгруппу. Оба штамма обнаружены в клещах *I. persulcatus* в Красноармейском районе и изолированы в 1985 г.. Нуклеотидная последовательность гена Е этих штаммов оказалась идентичной.

Таким образом, генетическая изменчивость и разнообразие вируса клещевого энцефалита дальневосточного генотипа оставляет много вопросов, что диктует необходимость дальнейших эколого-вирусологических и молекулярно-генетических исследований.

Литература

1. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Ред.: ДК Львов. М.: МИА, 2013. 1200 с.
2. Lvov DK, Shchelkanov MYu, Alkhovsky SV, Deryabin PG. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. Academic Press, 2015. 452 p.
3. Щелканов МЮ, Аристов А, Чумаков ВМ, Львов ДК. Историография термина «природный очаг». В сб.: Новые и возвращающиеся инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации. М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2014. 21-32.
4. Запорожец ТС, Беседнова НН, Калинин АВ и др. 80 лет на страже биологической безопасности у восточных рубежей России. Здоровье населения и среда обитания. 2021;(5):5-15.
5. Щелканов МЮ, Леонова ГН, Галкина ИВ, Андрюков БГ. У истоков концепции природной очаговости. Здоровье населения и среда обитания. 2021;(5):16-25.
6. Плетнев АГ, Ямщиков ВФ, Блинов ВМ. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита. Биоорганическая химия. 1989;15(11):1504-1521.
7. Mandl CW., Heinz FX., Stockl E, et al. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. Virology. 1989;173(1):291-301.
8. Злобин ВИ, Беликов СИ, Джигоев ЮП и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. 271 с.
9. Рудакова СА, Коломеец АН, Пеньевская НА, Рудаков НВ. Пространственная и временная структура природных очагов основных инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010;(6):37-39.
10. Коренберг ЭИ, Помелова ВГ, Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Наука, 2013. 464 с.
11. Leonova GN, Belikov SI, Kondratov IG, et al. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of TBEV strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. Virology. 2013;443:89-98.

12. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV et al. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. PLoS One. 2014;9(4):e94946.
13. Leonova GN, Belikov SI, Kondratov IG. Characteristics of far eastern strains of tick-borne encephalitis virus. Arch Virol. 2017;162(8):2211-2218.