

Е.В.Чаусов¹, В.А.Терновой¹, Е.В.Протопопова¹, С.Н.Коновалова¹, Ю.В.Кононова¹, Н.Л.Тупота¹,
Н.С.Москвитина², В.Н.Романенко², Н.В.Иванова², Н.П.Большакова², Г.Н.Леонова³, В.Б.Локтев¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СИБИРСКОГО СУБТИПА НА ПРИМЕРЕ СОВРЕМЕННОГО ИЗОЛЯТА КОЛАРОВО-2008

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово;

²Томский Государственный Университет, Томск; ³НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток

Определена полная последовательность генома штамма Коларово-2008 сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), изолированного из клеща в пригороде Томска. Анализ нуклеотидной последовательности показал, что уровень генетических отличий внутри сибирского подтипа ВКЭ может достигать 10 % по нуклеотидной последовательности и 7 % по аминокислотной последовательности для отдельных вирусных генов. Наиболее высокий уровень изменчивости имеет 3'-НТО генома сибирского генотипа ВКЭ, для которой уровень гомологии колеблется от 65 до 97 %. Самый высокий уровень гомологии штамм Коларово-2008 имеет со штаммом Vasilchenko, выделенным в Новосибирске в 1969 г. Уровень отличий между двумя томскими штаммами существенно выше, общее количество аминокислотных замен между томскими штаммами Zausaev и Коларово-2008 достигает 124, а уровень гомологии 3'-НТО составляет всего 79 %. Обнаруженная генетическая изменчивость сибирского субтипа ВКЭ имеет принципиальное значение для дальнейшего совершенствования генетической диагностики клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, штамм Коларово-2008, нуклеотидная последовательность, вирусный геном, флавивирусы

E.V.Chausov, V.A.Ternovoy, E.V.Protopopova, S.N.Konvalova, Yu.V.Kononova, N.L.Tupota, N.S.Moskvitina,
V.N.Romanenko, N.V.Ivanova, N.P.Bol'shakova, G.N.Leonova, V.B.Loktev

Molecular Genetic Analysis of the Complete Genome of Tick-Borne Encephalitis Virus (Siberia Subtype): Modern Kolarovo-2008 Isolate

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo; Tomsk State University, the Department of Ecology and Vertebrate Zoology; RAMS Siberian Branch Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

Determined is the complete genome sequence of Kolarovo-2008 strain (Siberia subtype) of Tick-borne encephalitis virus (TBEV), isolated from a tick in the suburbs of the Tomsk city. Nucleotide sequence analysis testifies of the fact that the level of genetic differences within the Siberian subtype of TBEV amounts to 10 % of the nucleotide sequence and to 7 % of amino-acid sequence for certain virus genes. 3'-НТО of the genome of Siberian subtype has the highest rate of variability and the homology level ranging from 65 to 97 %. Kolarovo-2008 and Vasilchenko (isolated in Novosibirsk in 1969) strains have the highest level of genome homology. The level of dissimilarity between the two Tomsk strains is substantially higher: the total number of amino-acid substitutions in Tomsk Zausaev and Kolarovo-2008 strains equals to 124, and 3'-НТО level of homology is 79 %. Identified genetic variability of the Siberian subtype of TBEV is of a great importance for further development and enhancement of tick-borne encephalitis virus diagnostics.

Key words: tick-borne encephalitis virus, Kolarovo-2008 strain, nucleotide sequence, virus genome, flaviviruses.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Он был открыт в 1937 г. на Дальнем Востоке. ВКЭ является прототипным представителем одноименного серокомплекса. В данный серокомплекс обычно включают различные штаммы вирусов клещевого энцефалита, Омской геморрагической лихорадки, Лангат, Повассан, Киассанурской лесной болезни, Шотландского энцефаломиеелита овец. Основным переносчиком ВКЭ являются клещи *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*, но также возможно заражение людей через употребление молока от инфицированных животных [8]. Вирусы клещевого энцефалита широко распространены в северной части Евро-Азиатского континента, где ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания. Заболеваемость клещевым энцефалитом ре-

гистрируется более чем в 25 европейских и 7 азиатских странах [4]. К настоящему времени известны 3 субтипа ВКЭ: дальневосточный, сибирский и западноевропейский [6]. Среди них географически наиболее широко распространен сибирский генотип, который доминирует в Сибири, Центральной Азии, на Урале и в европейской части Российской Федерации [1, 2]. На сегодняшний день в базе данных GenBank из более чем 30 опубликованных полноразмерных последовательностей геномов штаммов ВКЭ к сибирскому субтипу однозначно можно отнести только штаммы Vasilchenko, Zausaev и EK-328. Штаммы 178-79 и 886-84 занимают переходное положение между дальневосточным и сибирским субтипами ВКЭ, однако возможное их отнесение к сибирскому субтипу во многом спорно. Сибирский субтип ВКЭ вызывает

лихорадочные, менингеальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы заболевания. При тяжелых формах заболевания развиваются параличи и парезы, преимущественно верхнего плечевого пояса и дыхательной мускулатуры. Уровень летальности может достигать 2–8 %. Этот субтип ВКЭ способен вызывать хронический клещевой энцефалит у человека [3, 9]. Уровень встречаемости хронических форм в Западной Сибири составляет 1–1,7 % от всех случаев ВКЭ [10]. Известна только одна нуклеотидная последовательность штамма Zausaev ВКЭ, который был выделен из мозга пациента, погибшего от хронического клещевого энцефалита и укушенного клещом в Томске [9].

Нами также был выделен штамм ВКЭ Коларово-2008 из иксодового клеща, отловленного в южном пригороде Томска в окрестностях одноименного поселка. По результатам предварительного генотипирования по нуклеотидным последовательностям фрагмента гена белка Е и 5'-нетранслируемой области (5'-НТО), данный штамм был отнесен к сибирскому субтипу ВКЭ. Для получения новых данных о генетическом разнообразии штаммов сибирского субтипа мы решили провести его полноразмерное секвенирование и анализ генома в сравнении с известными штаммами сибирского, западноевропейского и дальневосточного субтипов.

Материалы и методы

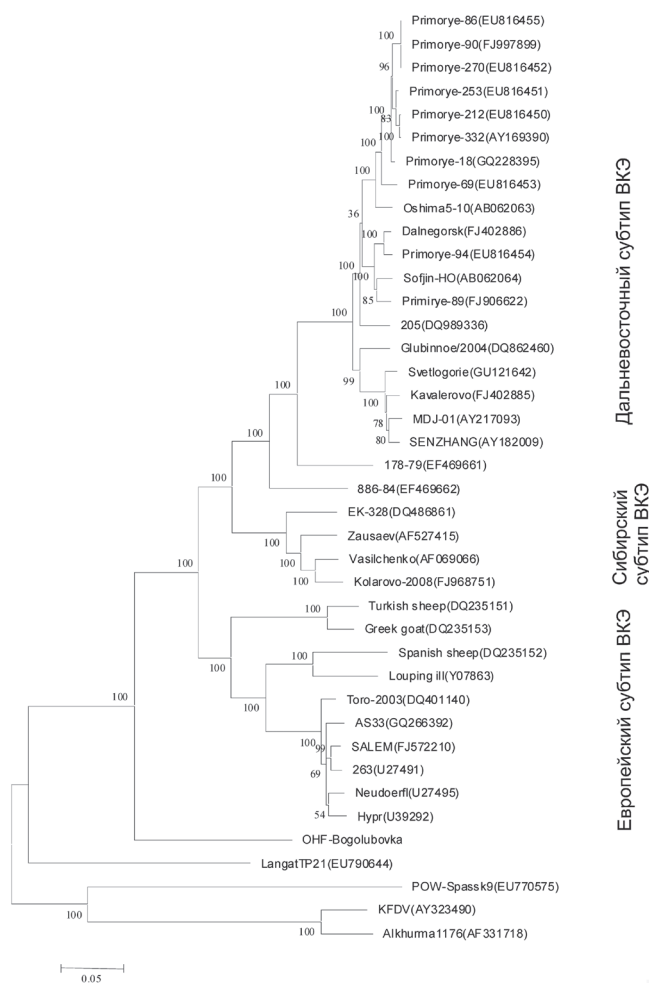
Штамм ВКЭ Коларово-2008 был выделен из иксодового клеща *Ixodes pavlovskyi*, отловленного на флаг в мае 2008 г. в южном пригороде Томска, около пос. Коларово. Штамм был трижды пассирован на культуре клеток почки эмбриона свиньи. Было проведено выделение вирусной РНК с использованием набора РИБО-золь-А (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), построение кДНК с использованием набора РЕВЕРТА-Л (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), амплификация перекрывающихся фрагментов генома с использованием авторского набора праймеров и определение последовательностей полученных ампликонов при помощи секвенатора ABI 3130XL. Полученная последовательность была депонирована в базу данных GenBank под номером FJ968751.

Полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов ВКЭ и родственных флавивирусов были взяты из базы данных GenBank (рисунок). Множественное сравнение последовательностей и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 4 [11]. Для реконструкции вторичной структуры РНК использовали программу MFold v.3.2 (<http://www.bioinfo.rpi.edu>). Реконструкцию вторичной структуры белков осуществляли с помощью программ PSIPRED v.2.6 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) и nnPredict (<http://www.cmpchem.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>). Для определения сайтов О- и N-гликозилирования в белках ис-

пользовали программы NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) и NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), а для поиска трансмембранных доменов в белках программу TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

Результаты и обсуждение

Длина полного генома штамма Коларово-2008 ВКЭ составила 10928 н.о. Уровни гомологии нуклеотидных последовательностей и выведенной аминокислотной последовательности штамма Коларово-2008 в сравнении с прототипными штаммами флавивирусов даны в табл. 1. Уровень гомологии внутри сибирского генотипа колеблется от 90 до 100 % для полной нуклеотидной последовательности и от 93 до 100 % для аминокислотной последовательности в сравнении с Коларово-2008. Дальневосточный и европейский субтипы отличаются от сибирского генотипа весьма существенно, а уровень отличий достигает 17 % по нуклеотидной последовательности и



Филогенетическое дерево вируса клещевого энцефалита, построенное на основе известных полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ, построенное по методу объединения ближайших соседей. Приведены оригинальные названия штаммов ВКЭ, депонированных в GenBank

Уровни гомологии (%) нуклеотидной/выведенной аминокислотной последовательностей штамма Коларово-2008 в сравнении с прототипными штаммами флавивирусов

Штамм	Участки генома													
	5'-НТО	C-CTHD	preM	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	2K	NS4b	NS5	3'-НТО	Всего
Zausaev	96	95/93	96/97	94/97	94/98	93/96	95/99	94/95	94/98	95/100	94/97	93/94	79	93/95
Vasilchenko	96	96/95	97/97	96/97	96/99	92/95	97/100	95/96	97/97	95/100	95/97	95/96	97	95/96
EK-328	-	93/94	91/95	92/96	93/98	90/96	93/98	93/96	91/98	94/95	91/95	91/94	65	90/93
178-79	-	88/86	85/94	85/95	86/96	82/88	83/96	86/93	83/92	89/100	84/94	84/92	64	83/90
886-84	-	88/88	86/94	87/96	86/96	81/87	86/96	86/94	85/95	86/100	84/95	85/92	79	84/91
ДВ-субтип	85-90	83-86/ 83-90	85-86/ 92-95	85/95-96	85-87/ 94-96	80-81/ 83-85	85-87/ 95-97	84-86/94	84-86/ 92-95	85-89/ 100	81-82/ 92-93	84-85/ 90-91	68-84	83-85/ 89-92
Западно-европейский субтип	89-90	84-86/83	83-85/ 93-94	84/94	83-84/ 93-94	80-81/ 84-86	82-83/ 92-94	84/92	84-87/ 94-96	79-82/ 100	80-82/ 90-92	84-85/91	65-75	82-83/ 89-90
Spanish sheep encephalitis	-	82/81	83/91	83/92	84/92	78/82	82/93	82/92	82/94	86/100	80/88	83/90	-	77/85
Turkish sheep encephalitis	-	83/84	79/89	81/92	82/93	81/84	86/94	83/91	82/94	84/95	79/90	83/90	-	77/85
Greek goat encephalitis	-	83/83	79/89	81/92	83/93	78/83	85/95	83/92	83/94	86/100	78/88	84/91	-	77/86
Louping ill	84	85/83	83/93	82/90	82/90	80/82	80/90	83/92	83/92	84/100	80/89	82/88	80	82/88
OHF	85	82/81	75/83	80/91	79/89	72/76	78/88	81/91	76/84	82/100	77/88	80/88	63	78/86
Langat	75	75/76	71/74	75/86	74/82	64/68	72/79	74/83	71/84	78/91	71/80	76/84	68	73/80
POW	63	60/52	62/62	70/77	68/75	57/55	63/69	70/78	64/71	56/56	67/70	72/81	58	67/72

11 % по аминокислотной.

При сравнении вторичных структур 5'-НТО и вирусных белков (С (C-CTHD), prM (M), E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) штамма Коларово-2008 со штаммами сибирского генотипа (Vasilchenko, Zausaev, EK-328) значительных отклонений не выявлено. Уровень гомологии и количество обнаруженных нуклеотидных и аминокислотных

замен были распределены по всему геному ВКЭ достаточно равномерно. Однако обращает на себя внимание, что вариабельность 3'-НТО генома была существенно выше. Уровень отличий достигал 21 % для штамма Zausaev и 35 % для EK-328. Столь существенная вариабельность этого района обнаружена также для европейского и дальневосточного субтипов ВКЭ. Эта вариабельность также характерна для

Таблица 2

Аминокислотные последовательности сайтов протеолиза C/CTHD, CTHD/prM NS4B/NS5 ВКЭ

Штамм	Сайт C/CTHD	Сайт CTHD/prM	Сайт NS4B/NS5
Коларово-2008	REKRR/STTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGAEG
Vasilchenko	RGKRR/STTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGAEG
Zausaev	RGKRR/STTDW	GVAFA/ATVRR	SGSRR/GGSEG
EK-328	RGKRR/STTDW	GATLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
178-79	RGKRR/SATDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGSDG
886-84	RGKRR/SVTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGSDG
ДВ-субтип	RGKRR/SAADW RGKRR/SAVDW RGKRR/SAVNW	GVTLA/ATVRK GMTFA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Европейский субтип	RGKRR/SATDW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSEG AGGRR/GGSEG
Spanish sheep	RGKRR/SVTDW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSEG
Turkish sheep	RGKRR/SATDW	GVVLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Greek goat	RGKRR/SATDW	GVVLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Louping ill	RGKRR/SVTNW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSDG
OHF	RGKRR/STTDW	SIALA/ATVRK	SGTRR/GGSEG
Langat	RGSRR/TTIDW	GMCLT/ATVRR	TGTRR/GGSEG
POW	RGRRR/SGVDW	TMAMA/TTIHR	QGARR/GGAEG

других исследованных флавивирусов.

Штамм Коларово-2008 имеет 99–131 аминокислотных замен в отличие от других известных последовательностей полипротеинов ВКЭ сибирского субтипа. Большое количество аминокислотных замен говорит о существенном генетическом разнообразии сибирского субтипа, что делает крайне сложным сравнение биологических свойств вирусов данного генотипа с конкретными мутациями в геноме этих вирусов. Из известных канонических последовательностей для ВКЭ нам удалось обнаружить в сайте протеолиза С/СТНД у штамма Коларово-2008 замену $G_{92} \rightarrow E$. В сайте протеолиза вирусного полипротеина NS4B/NS5 у штаммов Коларово-2008 и Vasilchenko, по сравнению со штаммами Zausaev, EK-328, 178-79, 886-84 и штаммами дальневосточного субтипа, присутствует замена $S_{2516} \rightarrow A$ (табл. 2). Остальные сайты протеолиза у штамма Коларово-2008 не модифицированы. Мутации в двух сайтах процессинга вирусного полипротеина (С/СТНД и NS4B/NS5) могут влиять на скорость репликации и патогенность вируса.

Проведенный анализ вторичных структур вирусных белков, расположения трансмембранных доменов и потенциальных сайтов гликозилирования не показал значительных различий штамма Коларово-2008 от остальных штаммов сибирского субтипа. Вторичная структура РНК 5'-НТО, важного элемента репликации вируса [7], у штамма Коларово-2008 имеет обычный вид для сибирского субтипа ВКЭ [5].

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показывает, что штамм Коларово-2008 внутри ветви сибирского генотипа группируется со штаммом Vasilchenko (рисунок). Ранее штамм Коларово-2008 был отнесен нами к сибирскому субтипу ВКЭ на основе анализа небольшого фрагмента 5'-НТО [5]. Полногеномный анализ полностью подтвердил справедливость использованного ранее подхода и показал принципиальную возможность использования нуклеотидной последовательности 5'-НТО для генотипирования ВКЭ. Коларово-2008 является типичным представителем сибирского субтипа, группируясь в филогенетическом древе со штаммами Vasilchenko, Zausaev и EK-328, обособленно от штаммов 178-79 и 886-84 (рисунок). Штаммы 178-79 и 886-84 ВКЭ были изолированы в районе озера Байкал, что предполагает существенное географическое удаление биотопов, где циркулируют данные штаммы ВКЭ от южных районов Западной Сибири. Штаммы 178-79 и 886-84 располагаются на филогенетическом древе отдельно от ветви сибирского генотипа и имеют гомологию со штаммом Коларово-2008 на уровне 83–84 % в нуклеотидной и 90–91 % в аминокислотной последовательностях. Примерно такие же уровни гомологии со штаммом Коларово-2008 свойственны для штаммов дальневосточного и европейского субтипов, что свидетельствует о том, что отнесение штаммов 178-79 и 886-84 к сибирскому субтипу некорректно. Судя по уровням гомологии

и расположению ветвей в филогенетическом древе, эти штаммы представляют собой отдельные субтипы ВКЭ и вопрос о выделении нового субтипа ВКЭ представляется вполне обоснованным.

Самый высокий уровень гомологии (95 % в нуклеотидной и 96 в аминокислотной последовательностях) штамм Коларово-2008 имеет со штаммом Vasilchenko, выделенным в Новосибирске в 1969 г. Уровень отличий двух Томских штаммов существенно выше и общее количество аминокислотных мутаций между штаммом Zausaev и Коларово-2008 достигает 124, а уровень гомологии 3'-НТО всего 79 %. Это не позволяет связать обнаруженные отличия в геноме этих штаммов ВКЭ с возможностью вызывать хронический клещевой энцефалит, что характерно для штамма Zausaev. Высокий уровень генетических отличий штаммов ВКЭ, изолированных в Томске, показывает, что генетическое разнообразие ВКЭ внутри сибирского субтипа весьма значительно даже в пределах одного города и его пригородов. Это хорошо согласуется с ранее известными данными по генетическому разнообразию между различными генотипами ВКЭ [1, 2, 5].

Таким образом, в настоящее время опубликованы 4 полноразмерных нуклеотидных последовательности геномов сибирского субтипа ВКЭ, три из которых изолированы на юге Западной Сибири. Анализ последовательности полных геномов сибирского субтипа ВКЭ показывает, что его генетическая вариабельность весьма широка. Она может достигать 10 % для нуклеотидной и 7 для аминокислотной последовательностей отдельных вирусных генов. Это позволяет предположить, что сибирский субтип ВКЭ имеет большой потенциал для генетической изменчивости, и появление новых геновариантов сибирского субтипа ВКЭ весьма вероятно. На наш взгляд, именно исследование генетической изменчивости, особенностей генетической организации вируса клещевого энцефалита может и должно стать базой для дальнейшего совершенствования методов профилактики, лечения и генетической диагностики клещевого энцефалита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. *Вопр. вирусол.* 2007; (6):4–13.
2. Локтев В.Б., Терновой В.А., Немцов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. *Вопр. вирусол.* 2007; 52(5):10–6.
3. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 1986. 78 с.
4. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V. et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(12):1040–55.
5. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Kononova S.N., Pershikova N.L. et al. Variability of the Tick-Borne Encephalitis Virus Genome in the 5' Noncoding Region Derived from Ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(4):365–75.
6. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 1999; 80:179–85.
7. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. A 5' RNA element promotes dengue virus synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* 2006; 20:2238–49.

8. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57:129–46.
9. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M, Turner S.L., Frolova M.P. et al. Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77:25–36.
10. Poponnikova T.V. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(S1):59–62.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24:1596–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Zlobin V.I., Verkhozina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Adel'shin R.V., Kozlova I.V. et al. [Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus]. *Vopr. Virusol.* 2007; (6):4–13.
2. Loktev V.B., Ternovoy V.A., Netesov S.V. [Molecular genetic characterization of tick-borne encephalitis virus]. *Vopr. Virusol.* 2007; 52(5):10–6.
3. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. [Chronic Tick-Borne Encephalitis]. Novosibirsk: Nauka, 1986. 78 p.

Authors:

Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Kononova S.N., Kononova Yu.V., Tupota N.L., Loktev V.B. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.
Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V. Bol'shakova N.P. Tomsk State University, the Department of Ecology and Vertebrate Zoology. Tomsk, Russia
Leonova G.N. RAMS Siberian Branch Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Vladivostok, Russia.

Об авторах:

Чайсов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Локтев В.Б. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru
Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П. Томский государственный университет. 634050, Томск, пр. Ленина 36. E-mail: zoo_tsu@mail.ru
Леонова Г.Н. НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН. 690028, г. Владивосток, ул. Сельская 1. E-mail: alinaleon@mail.primorye.ru

Поступила 20.07.11.