

УДК 578.833.26:578.53|.083.2:577.21.08

О.А. Юрченко¹, Д.А. Дубина¹, Н.А. Виноград²

¹ГУ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт имени И.И. Мечникова МЗ Украины», ул. Церковная, 2/4,

Одесса, 65003, Украина, тел.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69, Львов, 79010, Украина, тел.: +38 (032) 276 28 35,

e-mail: vynogradNO@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ

Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки E штаммов вируса клещевого энцефалита 150, 70, 120 и Саврань 160, изолированных в Северо-Западном Причерноморье в 1988–1990 гг. На основе филогенетического анализа расшифрованных последовательностей подтверждена циркуляция в Северо-Западном Причерноморье европейского (западного) генотипа вируса. Проведенный анализ аминокислотных последовательностей выявил у штаммов вируса клещевого энцефалита 150, 70, 120 и Саврань 160 наличие четырех маркерных аминокислотных замещений – 67(N), 266(R), 306(V) и 407(R), в доменах II и III эктодомена и трансмембранном сегменте.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, ген белка оболочки E, секвенирование.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) — передающийся иксодовыми клещами арбовирус, вместе с вирусами Западного Нила, желтой лихорадки, японского энцефалита и денге относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [17]. ВКЭ — один из основных патогенных для человека флавивирусов, эндемичен в северной части Евразии, где ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания [13].

Развитие молекулярно-генетических технологий позволило расшифровать структуру генома (полипротеина) ВКЭ и дифференцировать 3 основных генотипа — дальневосточный (генотип 1), европейский, или западный (генотип 2) и сибирский (генотип 3) [6]. Специфичные для



каждого генотипа участки расположены в генах белка оболочки E [10], неструктурных белков NS1 [7] и NS5 [2]. Как правило, генотип вируса определяет форму и тяжесть течения клинически выраженного заболевания [3] и экологически связан с одним из основных видов клещей-переносчиков: *Ixodes persulcatus* (сибирский и дальневосточный), *Ixodes ricinus* (европейский) [10]. Каждый из генотипов вируса, как правило, доминирует на определенной территории, где в то же время могут циркулировать штаммы, относящиеся к другим генотипам [5].

К настоящему времени данные о генетических особенностях популяции ВКЭ в Украине ограничены изучением пяти штаммов. Штамм Семекс, изолированный в Волынской области, был отнесен к сибирскому генотипу ВКЭ [1], а изолированный в Крыму штамм Сгітеа — к дальневосточному [10]. Нашими предыдущими исследованиями было установлено, что в Крыму, наряду с дальневосточным, циркулировал европейский (западный) генотип ВКЭ (штаммы 80, 85 и 290) [8].

Целью настоящей работы явилось изучение молекулярной структуры гена белка оболочки E штаммов ВКЭ, изолированных в Северо-Западном Причерноморье (СЗП) в 1988–1990 годах.

Материалы и методы

Изоляцию и поддержание жизнеспособности штаммов ВКЭ проводили по стандартной методике [4]. Характеристика исследованных штаммов представлена в таблице.

Таблица

Характеристика исследуемых штаммов ВКЭ, выделенных из иксодовых клещей в СЗП

Table

Characteristic of the studied tick-borne encephalitis virus strains isolated from ticks in the North-West Black Sea Coast

Название штамма	Вид, количество и фаза развития клещей, способ сбора	Место сбора	Дата сбора
120	<i>Dermacentor marginatus</i> , 26 имаго, на флаг	Одесская область, Килийский район, с. Приморское, 42 км трассы Килия-Вилково	13-14.05.1988
Саврань 160	<i>Ixodes ricinus</i> , 35 имаго, на флаг	Одесская область, Савранский район, лес	11-16.05.1989
150	<i>Dermacentor marginatus</i> , 53 имаго, с КРС*	Херсонская область, Генический район, остров Бирючий	10-13.04.1990
70	<i>Dermacentor marginatus</i> , 35 имаго, с КРС*	Херсонская область, Генический район, остров Бирючий	12-14.04.1989

Примечание: * — КРС — крупный рогатый скот.



Секвенирование, выравнивание и сборку консенсусных последовательностей гена белка оболочки E, оценку филогенетических взаимоотношений изучаемых штаммов с известными геномными последовательностями 111-ти штаммов, изолированных в разные годы из различных источников (база данных GenBank), и трех прежде секвенированных нами штаммов ВКЭ 80, 85 и 290 проводили по методике, описанной ранее [8]. При построении филогенетического дерева в качестве внешней группы использовали геномные последовательности вирусов комплекса клещевого энцефалита. Статистическую оценку филогенетического дерева проводили с помощью бутстрэп-анализа с созданием 1000 случайных выборок [16].

Результаты и их обсуждение

В результате секвенирования определены нуклеотидные последовательности гена белка оболочки E штаммов ВКЭ 120, 150, 70 и Саврань 160, изолированных из иксодовых клещей в Одесской и Херсонской областях в 1988-1990 гг. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил 100% идентичность гена E у всех четырех изучаемых штаммов, а также ранее секвенированных нами штаммов ВКЭ 80, 85 и 290, изолированных из иксодовых клещей в Крыму в 1989-1990 гг.

Расчет генетических или эволюционных дистанций показал более высокий уровень идентичности изучаемых штаммов со штаммами европейского генотипа — от 93,20% (штамм 12-8 изолирован из клещей *I. ricinus* в Италии в 2006 г., FJ917370.1 [9]) до 97,18% (штамм Рап изолирован от человека в Московской области в 1957 г., AF091015.1 [10]). При этом идентичность нуклеотидных последовательностей с сибирским и дальневосточным генотипами составила от 75,45% (штамм Usen-1 изолирован из клещей в России в 1986 г., EU072444.1 [1]) до 84,83% (штамм Vologda-2 изолирован из клещей *I. persulcatus* в России в 1990 г., AF229364.1 [18]).

Принадлежность штаммов 120, 70, 150, Саврань 160 к европейскому генотипу подтверждена данными филогенетического анализа (рис.) и наличием сигнатурных аминокислот 47(A), 88(G), 115(A), 178(E), 206(V), 267(A), 277(E), 317(A), 426(A), 431(S), 433(I) и 437 (V), характерных для штаммов европейского генотипа ВКЭ [10]. Данными филогенетического анализа установлено, что все изученные нами штаммы ВКЭ, изолированные на юге Украины, вместе со штаммом Рап формируют внутри европейского генотипа филогенетический кластер, обособленный от всех остальных штаммов европейского генотипа. Эволюция штаммов ВКЭ, изолированных на юге Украины, проходила независимо от остальных штаммов европейского генотипа ВКЭ и их дивергенция от общего со штаммом Рап предка произошла уже после разделения штаммов европейского генотипа на 2 кластера (рис.).



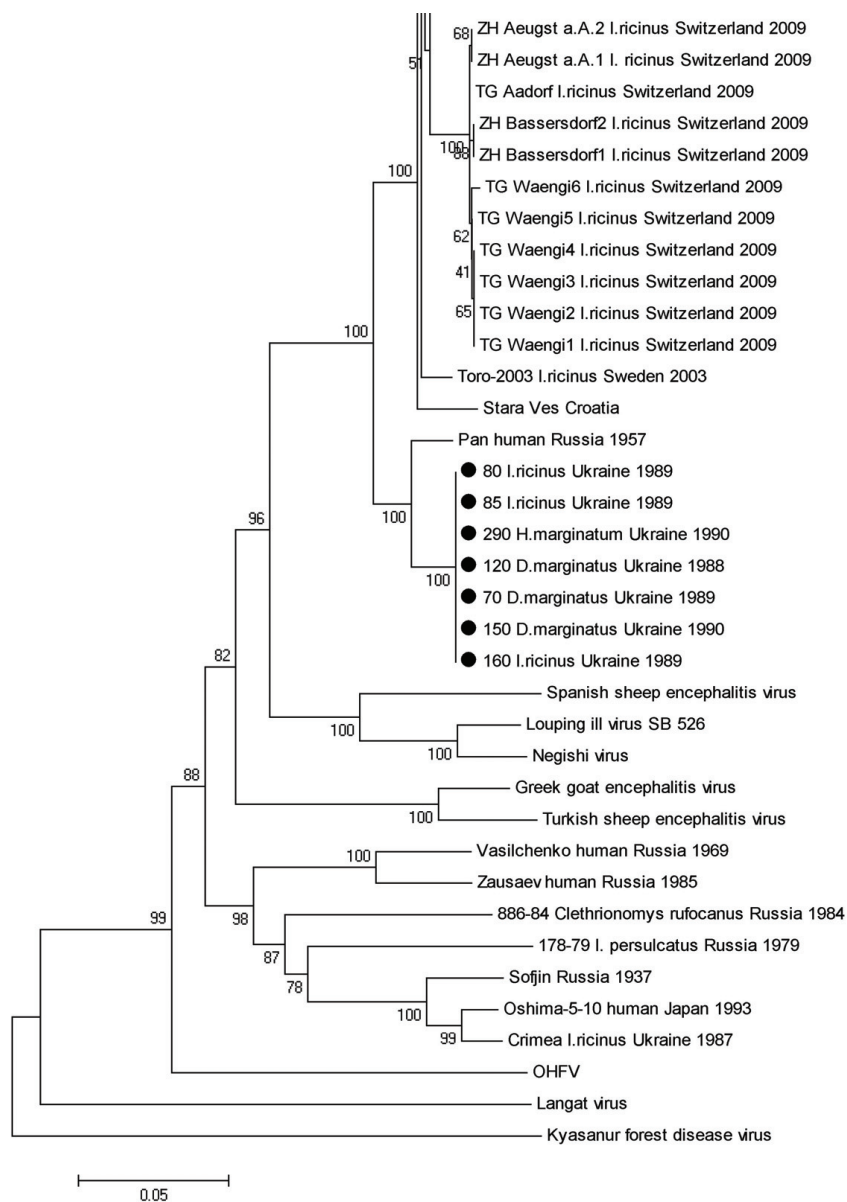


Рис. Фрагмент филогенетического дерева (NJ, Kimura 2-parameter model), иллюстрирующего генетическое родство южноукраинских изолятов ВКЭ (штаммы 80, 85, 290, 120, 70, 150, 160) и 111-ти прототипных штаммов ВКЭ, построено на основе нуклеотидных последовательностей целого гена белка оболочки E. Шкала показывает количество нуклеотидных замен на один сайт. Штаммы, секвенированные авторами, обозначены (●).

Fig. A fragment of a phylogenetic tree (NJ, Kimura 2-parameter model) illustrating the genetic relationships of the South Ukrainian TBEV isolates (strains 80, 85, 290, 120, 70, 150, 160) and 111 prototype strains of TBEV, constructed based on the nucleotide sequence of an envelope (E) protein gene. The scale indicates the number of nucleotide substitutions per site. Strains sequenced by the authors are indicated (●).

Анализ аминокислотных последовательностей показал наличие у южноукраинских штаммов четырех аминокислотных замещений — 67(N), 266(R), 306(V) и 407(R). Уникальное 67(N) и редко встречающееся 266(R) аминокислотные замещения расположены в домене II (аминокислотные остатки 52-136 и 190-284), выступающем над поверхностью вириона и, предположительно, участвующем в слиянии с клеточной мембраной [14]. Аргинин в позиции 266 обнаружен только у 2-х штаммов, изолированных из клещей *I. ricinus* в Швейцарии в 2009 г. (ZH Langnau a.A.1, NM468187.1 и ZH Langnau a.A.2, NM468188.1 [11]). У остальных анализируемых штаммов независимо от генотипа в позиции 67 находилась аспарагиновая кислота (D), а в позиции 266 — лизин (K).

Аминокислотное замещение 306(V), отличающее штаммы, изолированные на юге Украины от большинства анализируемых штаммов ВКЭ, расположено в домене III (аминокислотные остатки 303-395), который предположительно считается участком связывания с клеточным рецептором [14]. Валин (V) в позиции 306 обнаружен также у штаммов Pan (AF091015.1) и ZZ9 (изолирован из клещей *I. ricinus* в Австрии в 1985 г., AF091020.1) европейского генотипа [10], штаммов Oshima 5-10 (изолирован от человека в Японии в 1993 г., AB001026.1 [15]) и 178-79 (изолирован из клещей *I. persulcatus* в России в 1979 г., EF469661.1 [12]) дальневосточного генотипа и штаммов сибирского генотипа. У остальных анализируемых штаммов в позиции 306 находился метионин (M).

В трансмембранном сегменте за пределами эктодомена (аминокислотные остатки 1-395) у штаммов 120, 150, 70, 80, 85, 290 и Саврань 160 обнаружено аминокислотное замещение 407(R), характерное для штаммов сибирского и дальневосточного (в т.ч. штамм Crimea) генотипов и выявленное только у 2-х штаммов европейского генотипа — Pan (AF091015.1) и Stara Ves (изолирован в Хорватии, AF091018.1) [10].

Биологическая роль аминокислотных замещений до настоящего времени не ясна, но тот факт, что три из четырех маркерных аминокислот находятся на вирусной поверхности (67(N) и 266(R) — в домене II, 306(V) — в домене III эктодомена), может служить косвенным доказательством вовлечения этих маркерных аминокислот в процессы функционирования вируса.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили циркуляцию в СЗП европейского генотипа ВКЭ. Сравнительный филогенетический анализ гена белка оболочки E штаммов ВКЭ, изолированных в СЗП, показал гомогенность популяции европейского генотипа вируса на изучаемой территории. Установлено, что штаммы 120, 150, 70, 80, 85, 290 и Саврань 160 наиболее родственны штамму Pan и формируют с ним отдельный филогенетический кластер внутри европейского генотипа вируса. Вместе с тем, выявленная в СЗП циркуляция двух генотипов вируса — европейского и дальневосточного, свидетельствует о гетерогенности популяции ВКЭ в регионе.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адельшин Р.В., Злобин В.И., Беликов С.И. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах Балтии, Восточной и Юго-Восточной Европы // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2006. — № 2. — С. 27–34.
2. Верховина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В. и др. Эколого-эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита на территории Иркутской области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2008. — № 1. — С. 12–18.
3. Гратц Н. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение // Европейское региональное бюро ВОЗ. — 2005. — 158 с.
4. Громашевский В.Л. Методы изоляции арбовирусов / Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований). — М., 1986. — С. 90–93.
5. Злобин В.И., Верховина М.М., Демина Т.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. — 2007. — № 6. — С. 4–13.
6. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. — 2007. — № 5. — С. 10–16.
7. Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусол. — 2007. — № 5. — С. 16–21.
8. Юрченко О.А., Виноград Н.А., Дубина Д.А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Крыму // Вопросы вирусологии. — 2012. — Т. 57, № 3. — С. 40–43.
9. Carpi G., Bertolotti L., Rosati S., Rizzoli A. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy // J. Gen. Virol. — 2009. — Vol. 90, PT 12. — P. 2877–2883.
10. 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. — Vol. 80. — P. 179–185.
11. Gaumann R., Muhlemann K., Strasser M., Beuret C.M. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76, № 13. — P. 4241–4249.
12. Karan L.S., Zlobin V.I., Danchinova G.A. et al. Sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses // GenBank. — 2008. — Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/EF469661.1>.
13. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus — a review of an emerging zoonosis // Journal of General Virology. — 2009. — Vol. 90. — P. 1781–1794.

14. *Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature*. — 1995. — Vol. 375. — P. 291–298.

15. *Takashima I., Morita K., Chiba M. et al.* A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35, № 8. — P. 1943–1947.

16. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. — 2011. — Vol. 28. — P. 2731–2739.

17. *Yun S.-M., Kim S.-Y., Han M.G. et al.* Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses isolated in South Korea // *Vector-borne and zoonotic disease*. — 2009. — Vol. 9, № 3. — P. 287–293.

18. *Zlobin V.I., Mamaev L.V., Butina T.V. [et al.]* Sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses for genetic typing // *GenBank*. — 2000. — Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF229364.1>.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2013 р.

О.О. Юрченко¹, Д.О. Дубіна¹, Н.О. Виноград²

¹ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут імені І.І. Мечникова МОЗ України», вул. Церковная, 2/4, Одеса, 65003, Україна, тел.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, тел.: +38 (032) 276 28 35, e-mail: vynogradNO@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ КЛІЩОВОГО ЕНЦЕФАЛІТУ, ЯКИЙ ЦИРКУЛЮЄ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОМУ ПРИЧОРНОМОР'І

Реферат

Вивчення молекулярної структури гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту, ізолюваних в Північно-Західному Причорномор'ї — мета дослідження.

Секвенування нуклеотидних послідовностей гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160, ізолюваних із іксодових кліщів в Одеській і Херсонській областях в 1988-1990 роках, проводили методом «термінаторів» (за Сенгером). Філогенетичний аналіз отриманих послідовностей здійснювали методом приєднання сусідів. Генотип штамів визначали на основі даних філогенетичного аналізу і за наявністю сигнатурних амінокислот.



Секвеновано нуклеотидні послідовності гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160. На основі філогенетичного аналізу підтверджено циркуляцію в Північно-Західному Причорномор'ї європейського (західного) генотипу вірусу. Показана ідентичність гену білка оболонки Е у ізольованих в регіоні штамів європейського генотипу вірусу кліщового енцефаліту. Встановлена найбільша спорідненість штамів, що вивчали, зі штамом Рап, з яким вони складають окрему від решти штамів європейського генотипу вірусу філогенетичну групу. Проведений аналіз амінокислотних послідовностей виявив у штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160 наявність чотирьох маркерних амінокислотних заміщень — 67(N), 266(R), 306(V) і 407(R), в доменах II і III ектодомену і трансмембранному сегменті.

Визначена молекулярна структура гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліта, ізольованих в Північно-Західному Причорномор'ї. Поряд з далекосхідним, встановлена циркуляція в регіоні європейського (західного) генотипу вірусу кліщового енцефаліту.

Ключові слова: вірус кліщового енцефаліту, ген білка оболонки Е, секвенування.

O.A. Yurchenko¹, D.A. Dubina¹, N.A. Vynograd²

¹SB «Mechnikov Ukrainian Anti-Plague Research Institute of the Ministry of Health of Ukraine», 2/4, Tserkovnaya str.,

Odessa, 65003, Ukraine, tel.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69, Pekarska str.,

Lviv, 79010, Ukraine, tel.: +38 (032) 276 28 35,

e-mail: vynogradNO@ukr.net

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS CIRCULATING IN THE NORTHWEST BLACK SEA COAST

Summary

Aim. To study the molecular structure of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains isolated in the Northwest Black Sea Coast.

Materials and methods. Nucleotide sequencing of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and 160 Savran, isolated from ticks in Odessa and Kherson regions in 1988-1990, was carried out by chain-termination method (by F. Sanger). Phylogenetic analysis of these sequences was performed by neighbor-joining method.



Strains genotype was determined on the basis of phylogenetic analysis and presence of the signature amino acids.

Results. Nucleotide sequencing of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and 160 Savran was carried out. Based on phylogenetic analysis the circulation of the European (Western) genotype of tick-borne encephalitis virus in the Northwest Black Sea Coast was confirmed. The identity of the envelope (E) protein gene in the tick-borne encephalitis virus strains of the European genotype isolated in the region was shown. The tick-borne encephalitis virus strains studied were the most related to Pan strain and formed with it the phylogenetic group separated from the other tick-borne encephalitis virus strains of the European genotype. The analysis of amino acid sequences of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and Savran 160 revealed presence of four marker amino acid replacements — 67 (N), 266 (R), 306 (V) and 407 (R), in domains II and III of the ectodomain and in the transmembrane segment.

Conclusions. The molecular structure of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains isolated in the Northwest Black Sea Coast was determined. Along with the Far Eastern, the circulation of the European (Western) genotype of tick-borne encephalitis virus in the region was revealed.

Key words: tick-borne encephalitis virus, envelope (E) protein gene, sequencing.

