

На правах рукописи

ТКАЧЕВ СЕРГЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ НОВОСИБИРСКА
И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

д.х.н., профессор, академик РАН **Власов Валентин Викторович**

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович, д.б.н., профессор
Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
заведующий отделом молекулярной вирусологии flavивирусов и вирусных гепатитов

Беликов Сергей Иванович, д.б.н., профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН,
заведующий лабораторией аналитической биоорганической химии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систематики и экологии животных СО РАН

Защита состоится « ___ » _____ 2015 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2015 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем заболевания центральной нервной системы человека, приводящего к серьезным осложнениям вплоть до летального исхода. Впервые он был открыт на Дальнем Востоке в 1937 году экспедицией под руководством Л.А. Зильбера. Многочисленные исследования последующих десятилетий продемонстрировали, что ареал ВКЭ находится на обширной территории Евразии и тесно связан с наличием переносчиков – иксодовых клещей, - на данных территориях.

Средняя заболеваемость клещевым энцефалитом в России колебалась от 1,56 до 7 случаев на 100 тыс. населения в год в период между 1993 и 2013 гг. с тенденцией к уменьшению за последние годы (Государственный доклад..., 2014). Территория Западной Сибири является эндемичной для ВКЭ, причем в ряде областей (например, в Томской области) наблюдается частота заболеваемости клещевым энцефалитом выше среднего по стране (14,99 случаев на 100 тыс. населения в 2013 году). При этом заболеваемость клещевым энцефалитом в Новосибирской области, расположенной в 200 км к югу от Томска, значительно ниже и в 2013 году составляла 7,86 случаев на 100 тыс. населения (Государственный доклад..., 2014).

На территории Новосибирской области ареал ВКЭ охватывает 22 района области, включая лесопарковые зоны городов Новосибирска, Бердска и Оби, где на протяжении ряда лет отмечается высокая численность иксодовых клещей и их высокая зараженность переносимыми ими патогенами (Государственный доклад..., 2014). Природный очаг ВКЭ на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра (Академгородка) является объектом изучения с конца 70-х годов прошлого столетия (Природа Академгородка..., 2007). Тем не менее, несмотря на характеризацию ВКЭ на данной территории методом молекулярной гибридизации вирусных РНК с радиоактивно мечеными специфичными к ВКЭ зондами, а также с помощью изучения гемагглютинирующих свойств и нейровирулентности (Бахвалова и др., 2007), детальных исследований генетического разнообразия вируса в данном очаге ранее не проводилось.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование генетического разнообразия и характеристика особенностей вируса клещевого энцефалита на территории природного очага лесопарковой зоны Новосибирского Академгородка и окрестностей города Новосибирска.

Для достижения данной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Выявить вирус клещевого энцефалита в клинических образцах крови пациентов с различными формами болезни и охарактеризовать выявленные изоляты вируса молекулярно-генетическими методами.

2. Провести молекулярно-генетический анализ штаммов и изолятов ВКЭ, выявленных на территории лесопарковой зоны Новосибирского Академгородка и окрестностей города Новосибирска в иксодовых клещах.
3. Провести сравнение различных способов генотипирования изучаемых изолятов и штаммов ВКЭ.
4. Провести оценку возраста ВКЭ на исследуемой территории.
5. Сравнить полученные результаты молекулярно-генетического анализа исследуемых изолятов и штаммов ВКЭ с вариантами вируса с других территорий Евразии.

Научная новизна и практическая значимость работы. Были впервые получены данные о генетическом разнообразии ВКЭ в природных очагах Новосибирского Академгородка. Было показано практически полное доминирование ВКЭ сибирского генотипа на данных территориях, хотя РНК ВКЭ дальневосточного и западного генотипа выявлялись в единичных случаях.

Впервые было показано, что внутри сибирского генотипа ВКЭ на исследуемых территориях можно выделить три субгенотипа – субгенотипы Васильченко, Заусаев и субгенотип, неописанный ранее. Для выявленных субгенотипов была проведена оценка их возраста внутри сибирского генотипа на данных территориях. Было показано, что штаммы, соответствующие субгенотипу Васильченко, дивергировали от общего предка наиболее рано (около 220 лет назад), в то время как субгенотип Заусаев и третий субгенотип разделились позже (около 135 лет назад).

Впервые было проведено сравнение генетической структуры сибирского генотипа ВКЭ в природном очаге на территории Новосибирского Академгородка с вирусами сибирского генотипа на других территориях Евразии. Было показано, что сибирский генотип ВКЭ является гетерогенным по своему составу, и на основании анализа уровней гомологии последовательностей и филогенетических деревьев может быть разделен на 6 субгенотипов, причем на разных территориях ВКЭ сибирского генотипа представлен разным набором субгенотипов.

Впервые были определены полногеномные последовательности штаммов “группы 886-84” ВКЭ, выделенных на территории Восточной Сибири и относимых ранее рядом авторов к сибирскому генотипу, и охарактеризованы как потенциально новый генотип вируса.

Вклад автора. Все эксперименты и анализ полученных данных сделаны автором лично за исключением капиллярного электрофореза подготовленных для секвенирования ДНК проб, выполненного сотрудниками Центра коллективного пользования “Геномика” СО РАН либо н.с. ЛММБ ИХБФМ СО РАН Тикуновым А.Ю.; сбора образцов клещей, осуществленного сотрудниками ИСЭЖ СО РАН Пановым В.В. и Ливановой Н.Н.; сбора образцов крови, проводимого сотрудниками МИКБ №1 г. Новосибирска.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы представлены на 7 российских и 9 международных конференциях: международная конференция «Фундаментальные науки - биотехнологии и медицине», 2006; Russian-Great Britain workshop of young scientists “Emerging Diseases: Tick-transmitted and influenza”. Novosibirsk, 2007; IX International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Germany, 2007; научная конференция «Актуальные вопросы региональной инфекционной патологии», Иркутск, 2007; конференция “Фундаментальные науки – медицине” Новосибирск, 2008; X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Germany, 2009; всероссийская конференция «Актуальные проблемы природной очаговости болезней», Омск, 2009; III межрегиональная научная конференция паразитологов Сибири и Дальнего Востока, Новосибирск, 2009; Japan-Russia International Workshop, The 54th ISTC Japan Workshop, Japan, 2010; научная конференция «Фундаментальные науки - медицине», Новосибирск, 2010; научная конференция “Этиологические, эпидемиологические и клинические аспекты инфекционных болезней”, Иркутск, 2010; XI International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases, Germany, 2011; международная научная конференция “Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами”, Иркутск, 2012; XII International Jena symposium on tick-borne diseases, Germany, 2013; Российская научная конференция с международным участием "Актуальные проблемы клещевого энцефалита", Москва, 2013; Joint Conference: German Symposium on Zoonoses Research 2014 and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, Germany, 2014.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 192 страницах, содержит 36 рисунков, 13 таблиц, 6 приложений. Библиография включает 312 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выявление и генотипирование ВКЭ из клинических образцов крови пациентов

Территория Новосибирской области, включая лесопарковые зоны городов Новосибирска, Бердска и Оби, является эндемичной для ВКЭ, и, соответственно, на данных территориях регистрируются случаи заболевания клещевым энцефалитом. Поэтому на первом этапе работы для оценки генетического разнообразия ВКЭ использовали клинические образцы крови людей, госпитализированных после укусов клещами на территории Новосибирской области в окрестностях г. Новосибирска.

На основании нуклеотидных последовательностей фрагментов геномов

ВКЭ штаммов, относящихся к дальневосточному, сибирскому и европейскому (Esker et al., 1999) генетическим типам, были сконструированы олигонуклеотиды E3, E4 и E5, E6, соответствующие фрагменту 1089-2386 н.о. генома ВКЭ (штамм Софьин (JX498940)), С использованием РНК штаммов ВКЭ, принадлежащим различным генотипам, было показано, что выбранные праймеры могут быть использованы для их выявления (Рис. 1).

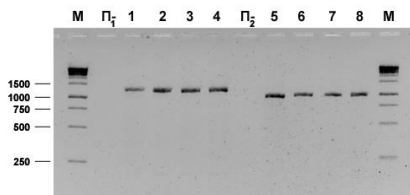


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-образцов фрагмента гена E ВКЭ различных генотипов в 1,5% агарозном геле. Дорожки P₁-, 1-4 – ПЦР-фрагменты, полученные с использованием праймеров E3-E4; дорожки P₂-, 5-8 - ПЦР-фрагменты, полученные с использованием праймеров

E5-E6; Дорожки 1, 5 – ВКЭ дальневосточного генотипа; 2, 3, 6, 7 – ВКЭ сибирского генотипа, субгенотипы Васильченко и Заусаев; 4, 8 – ВКЭ западноевропейского генотипа; М – маркеры длины ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); P₁-, P₂- отрицательные контроли.

Выявление РНК ВКЭ проводили в образцах крови пациентов, госпитализированных на 1-35 день после укуса клещами в Муниципальную инфекционную клиническую больницу №1 г. Новосибирска с подозрением на инфекции, вызванные переносимыми клещами патогенами, в эпидемиологический период 2003 (146 образцов) и 2004 годов (308 образцов), до проведения этиотропной терапии. Диагнозы клещевого энцефалита ставились на основании эпидемиологического анамнеза (укус клеща, нахождение на эпидемиологически неблагоприятной территории), клинических симптомов и по результатам лабораторных ИФА-тестов.

РНК ВКЭ была выявлена в 14 пробах крови больных с различными формами протекания болезни. Для положительных по ВКЭ образцов определяли нуклеотидную последовательность полученных ПЦР-фрагментов. Определенные нуклеотидные последовательности выравнивали, проводили поиск гомологии и построение филограммы. Было показано, что все выявленные последовательности имеют высокий уровень гомологии (>98%) со штаммом Софьин дальневосточного генотипа ВКЭ. Анализ филограммы, построенной методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) на основании фрагментов последовательностей длиной 329 н.о. показал, что все 14 изолятов ВКЭ относятся к дальневосточному генетическому типу (уровень гомологии >98%) (Рис. 2).

2. Анализ разнообразия штаммов ВКЭ, выделенных в природных очагах Новосибирского научного центра и его окрестностях

Данные, полученные при выявлении ВКЭ в крови пациентов, вследствие

П1 – инаппарантная форма КЭ; П2 – стертая форма; П3, П5, П7 –менингеальная форма; П4 - менингеальная форма, двухволновое течение; П6 – лихорадочная форма; П8 – хроническая очаговая форма; П9-П14 – неясная этиология (без специфических симптомов).

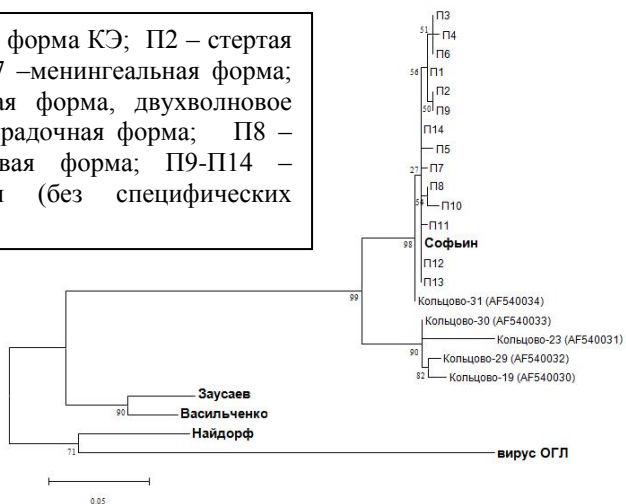


Рис. 2. Филограмма, построенная на основании последовательностей фрагмента гена Е ВКЭ методом максимального правдоподобия (maximum likelihood), выявленных в образцах крови пациентов с различными формами заболевания. В узлах филограммы указаны индексы поддержки. Жирным выделены прототипные штаммы, соответствующие различным генотипам и субгенотипам ВКЭ, а также внешняя группа (вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ)).

малой выборки положительных образцов, не позволили сделать однозначный вывод о распределении генотипов вируса на территории Новосибирского научного центра и его окрестностей. Иксодовые клещи (*I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*) доминируют в поддержании циркуляции природноочаговых инфекций на территории Новосибирской области (Ливанова и др., 2011; 2012) и являются основными переносчиками возбудителей клещевого энцефалита (Злобин, Горин, 1996; Иерусалимский, 2001). Поэтому, на следующем этапе работы был проведен анализ последовательностей фрагментов геномов коллекции штаммов ВКЭ, выделенных в окрестностях г. Новосибирска из иксодовых клещей.

Методами обратной транскрипции с последующими двухраундовой ПЦР и секвенированием полученных ПЦР-фрагментов были получены последовательности фрагментов гена Е 124 штаммов ВКЭ из коллекции Института систематики и экологии животных СО РАН (любезно предоставленных Бахваловой В.Н.), выделенных методом биопробы на уровне 2–16-го пассажей на лабораторных мышах от собранных с растительности имаго таежного клеща *Ixodes persulcatus* Schulze на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра (106

штаммов) и окрестностей г. Новосибирска (18 штаммов) в 1981-2002 гг. Также для анализа из базы данных GenBank были взяты последовательности фрагментов геномов 14 штаммов ВКЭ, выделенных на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра в 2007-2011 гг..

Сравнительный анализ последовательностей изученных образцов показал их сходство со штаммами ВКЭ сибирского генетического типа с высокой степенью гомологии (>92% гомологии с подтипом Заусаев и >93% гомологии с подтипом Васильченко) и достоверные отличия от штаммов западноевропейского и дальневосточного генетических типов ВКЭ (<87% и 85% гомологии, соответственно). Для дальнейшего молекулярно-генетического анализа нуклеотидных последовательностей были отобраны последовательности, содержащие фрагмент гена E длиной 450 п.н. (275-724 н.о. от начала гена E ВКЭ штамма Софьин), соответствующих фрагменту белка E ВКЭ с 93 по 241 аминокислотный остаток.

Для использования дистанционных методов построения дендрограмм и филограмм необходим выбор эволюционной модели, наиболее подходящей для анализируемых последовательностей. С помощью программ jModelTest (Posada, 2008) и Mega 5.05 (Tamura et al., 2011) проводили анализ информационного критерия Акаике (Akaike Information Criterion) (AIC) (Akaike, 1973), минимум значения которого показал, что обобщенная реверсивная модель (generalized time reversible) с учетом инвариантности сайтов (GTR+I) (Rodrigues et al., 1990) с наибольшей вероятностью описывает эволюционный процесс для исследуемых последовательностей.

Выравнивание последовательностей осуществляли методом ClustalW с помощью программы Mega 5.05 (Tamura et al., 2011), Построение филограмм дистанционными методами (метод присоединения соседей (neighbor- joining (NJ) (Saitou, Nei, 1987)) проводили с использованием программы Mega 5.05. В качестве внешней группы использовали последовательность фрагмента генома флавивируса Омской геморрагической лихорадки (NC_005062). В качестве прототипных штаммов использовали штаммы дальневосточного (штамм Софьин (X07755)), сибирского (Заусаев (AF527415) и Васильченко (AF069066)), европейского (Найдорф (U27495)) генотипов, а также штаммы 178-79 (EF469661) и 886-84 (EF469662), относящиеся к возможным новым генотипам ВКЭ. Анализ филограммы показал, что все исследуемые штаммы формировали единый кластер с прототипными штаммами ВКЭ, относящимися к сибирскому генотипу (Рис. 3). Было показано, что внутри кластера сибирского генотипа штаммы образуют три субкластера (подтипа или субгенотипа): первый субкластер относится к субгенотипу Васильченко ВКЭ (I), второй – к субгенотипу Заусаев (II), и третий, наиболее близкий на филогенетическом дереве ко второму субкластеру, для которого не был найден прототипный штамм в базе данных GenBank (III).

Также, анализ исследуемых последовательностей фрагментов гена E штаммов ВКЭ проводили с использованием метода построения филогенетических сетей (phylogenetic networks) с помощью программы SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006). При визуализации полученных данных было продемонстрировано, что исследуемые последовательности штаммов ВКЭ сибирского генотипа разделяются на три отдельные группы, соответствующие подгруппам I (Васильченко), II (Заусаев) и III, выявленных ранее при анализе филогенетических деревьев (Рис. 4).

Правомочность выделения третьего подтипа внутри сибирского генотипа была также подтверждена анализом уровней гомологии последовательностей для штаммов как внутри каждой из подгрупп, так и между подгруппами. Было показано, что внутри каждой из подгрупп уровень гомологии последовательностей составляет 98% и выше, в то время как межгрупповые различия составляли 93-96% (Табл. 1).

3. Анализ разнообразия ВКЭ в индивидуальных иксодовых клещах

Один из трех подтипов ВКЭ, выявленных внутри сибирского генотипа при анализе полученных последовательностей фрагмента гена E различных штаммов ВКЭ, не был описан ранее, в связи с чем возникает вопрос, не является ли выявленная группа штаммов артефактом вследствие культивирования вируса в лабораторных животных, так как при пассировании штаммов флавивирусов на лабораторных животных возможны генетические изменения различных участков их геномов [Якименко и др., 1996; Lee et al., 1997]. Также, методом биопробы могут не выявляться штаммы ВКЭ с пониженной жизнеспособностью и вирулентностью, что также может вносить искажения в наблюдаемое распределение генотипов и субгенотипов вируса в популяции в исследуемых природных очагах. Поэтому, на следующем этапе работы проводили выявление и молекулярно-генетические исследования фрагментов геномов ВКЭ, выделенных из иксодовых клещей на тех же территориях, что и штаммы, без предварительного культивирования.

Для выявления вирусных РНК в образцах клещей, собранных на территории лесопарковой зоны Академгородка и окрестностей г. Новосибирска, была сконструирована система праймеров для двухраундовой ПЦР, соответствующих 3'- концу гена E и 5'- концу гена NS1 (фрагмент 2196-2536 н.о. генома ВКЭ). Было показано, что в ОТ-ПЦР данная система праймеров обеспечивала увеличение чувствительности выявления вирусных РНК на три порядка, по сравнению с ПЦР-системой, использованной ранее. Было показано, что сконструированные праймеры выявляют ВКЭ всех известных генотипов (Рис. 5).

На следующем этапе работы методом двухраундовой ПЦР с

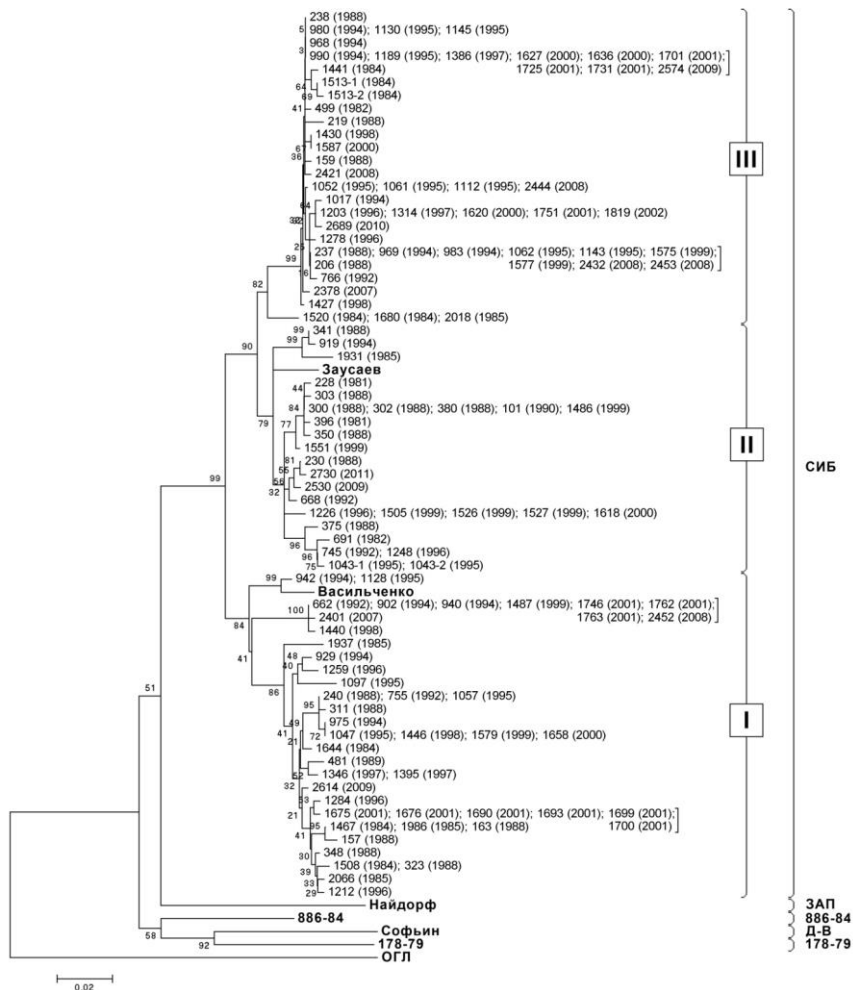


Рис. 3. Филограмма, построенная на основании последовательностей фрагмента гена Е (275-724 н.о.) методом ближайших соседей (neighbor-joining). В узлах филограммы указаны индексы поддержки. Жирным выделены прототипные штаммы, соответствующие различным генотипам и субгенотипам ВКЭ, а также внешняя группа (вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ)). I – субгенотип Васильченко; II – субгенотип Заусаев; III – субгенотип, неописанный ранее. СИБ – сибирский генотип; ЗАП – западноевропейский генотип; Д-В – дальневосточный генотип; 886-84 – штаммы группы “886-84”; 178-79 – штаммы группы “178-79”.

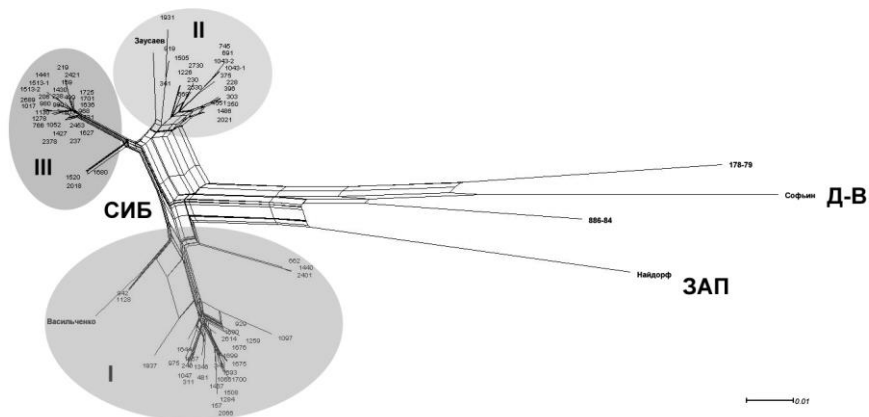


Рис. 4. Филогенетическая сеть, построенная на основании последовательностей фрагмента гена E (275-724 н.о.) штаммов ВКЭ, выделенных на территории Новосибирского Академгородка и его окрестностей с помощью программы SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006). Жирным выделены прототипные штаммы, соответствующие различным генотипам и субгенотипам ВКЭ. I – субгенотип Васильченко; II – субгенотип Заусаев; III – субгенотип, не описанный ранее. СИБ – сибирский генотип; ЗАП – западноевропейский генотип; Д-В – дальневосточный генотип; 886-84 – штаммы группы “886-84”; 178-79 – штаммы группы “178-79”.

Таблица 1. Степень гомологии среди последовательностей фрагмента гена E штаммов ВКЭ, относящихся к разным подтипам сибирского генотипа.

| | Подгруппа I (подтип Васильченко) | Подгруппа II (подтип Заусаев) | Подгруппа III |
|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Подгруппа I (подтип Васильченко) | 98-100% | 92-97% | 92-97% |
| Подгруппа II (подтип Заусаев) | 92-97% | 98-100% | 96-97% |
| Подгруппа III | 92-97% | 96-97% | 98-100% |

использованием сконструированной системы праймеров проводили выявление вирусных РНК из образцов индивидуальных иксодовых клещей, собранных на территории лесопарковой зоны Новосибирского Академгородка и прилегающих территорий в 2007-2010 гг., либо с людей, обратившихся по поводу укуса в Пункт вакцинопрофилактики ЦКБ СО РАН и Центра новых медицинских технологий в 2009-2010 гг. Затем для положительных по ВКЭ образцов определяли нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов генов E-NS1 ВКЭ длиной 341 п.н.

Анализ последовательностей, соответствующих вариантам вируса,

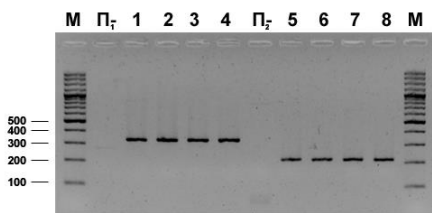


Рис. 5. Электрофореграмма ПЦР-образцов фрагментов гена E ВКЭ различных генотипов в 2% агарозном геле. Дорожки П₁-, 1-4 – ПЦР-фрагменты, полученные с использованием праймеров E7-E10; дорожки П₂-, 5-8 - ПЦР-фрагменты, полученные с использованием

праймеров E9-E8; Дорожки 1, 5 – ВКЭ дальневосточного генотипа; 2, 3, 6, 7 – ВКЭ сибирского генотипа, субгенотипы Васильченко и Заусаев; 4, 8 – ВКЭ западноевропейского генотипа. П₁-, П₂- - отрицательный контроль.

выявленным в индивидуальных клещах, показал доминирование ВКЭ, относящихся к сибирскому генетическому типу с уровнем гомологии 89-98% на территории Академгородка и прилегающих к нему территорий. Также сибирский генотип выявлялся в иксодовых клещах, собранных с людей после укуса в окрестностях городов Новосибирска, Красноярска и на Алтае. Тем не менее, два образца ВКЭ, выявленные в индивидуальных иксодовых клещах с территории лесопарковой зоны Новосибирского Академгородка относились к дальневосточному генотипу, и один – к западноевропейскому.

Далее проводили построение и анализ дендрограммы для полученных последовательностей изолятов ВКЭ из индивидуальных клещей. Для сравнения, были использованы нуклеотидные последовательности данного фрагмента генома для ряда штаммов ВКЭ, относящиеся к различным подтипам сибирского генотипа ВКЭ, а также штаммов ВКЭ разных генотипов. Методом ближайших соседей (NJ) было показано, что исследуемые варианты ВКЭ, относящиеся к сибирскому генотипу, разделяются на 3 субгенотипа - Васильченко (I), Заусаев (II) и субгенотип, не описанный ранее (III) (Рис. 6), что было описано ранее и для коллекции штаммов ВКЭ, собранных на территории ННЦ в 1981-2011 гг. Более того, анализ генетического разнообразия ВКЭ сибирского генотипа, выявленных в клещах, собранных на флаг в природных очагах, и снятых с покусанных пациентов, показал, что как в первых, так и во вторых образцах выявляются все три субгенотипа.

4. Типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основании аминокислотных последовательностей

В настоящее время, другой подход к разделению на генетические типы и подтипы вируса клещевого энцефалита основан на анализе маркерных аминокислот. Так, было показано, что у ВКЭ сибирского генетического типа в позиции 206 последовательности белка E находится остаток лейцина (L), а по позиции 234 сибирский генотип можно разделить на 2 подтипа с

прототипными штаммами Заусаев (гистидин (H)) и Васильченко (глутамин (Q)) (Злобин и др., 2003).

Анализ аминокислотных последовательностей фрагмента белка E ВКЭ, выведенных на основании полученных нуклеотидных последовательностей для штаммов, выделенных в Западной Сибири, показал, что в позиции 206 а.о. белка E все исследованные штаммы имеют остаток лейцина, т.е. относятся к сибирскому генотипу. При анализе позиции 234 а.о. белка E было обнаружено, что наряду с описанными стандартными аминокислотными остатками (гистидин (H) (115 штаммов) или глутамин (Q)) (2 штамма) различных подтипов сибирского генетического типа, для шести штаммов (230, 323, 668, 1508, 2530, 2730) была выявлена нетипичная маркерная аминокислота тирозин (Y).

Другой подход к типированию штаммов ВКЭ с использованием маркерных аминокислот был предложен при изучении штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на территории Прибалтики и Скандинавии (Golovljova et al., 2008). Было показано, что штаммы сибирского генотипа так называемой “балтийской” группы отличаются от штаммов “сибирской” группы по позициям 175 и 313 а.о. белка E, и содержат остаток аспарагина (N) вместо треонина (T) и остаток треонина (T) вместо аланина (A), соответственно. Анализ последовательностей белка E исследуемых штаммов показал, что для их большинства наблюдается соответствие предложенному подходу, т.е. штаммы относятся к “сибирской” группе ВКЭ сибирского генотипа. Тем не менее, два из них содержали остаток аспарагина в позиции 175 а.о., как и штаммы “балтийской” группы, в то время как по позиции 313 а.о. эти же штаммы могут быть отнесены к “сибирской группе” ВКЭ (Рис. 7А, Б).

Сравнение соотношений между различными генетическими подтипами в исследуемой коллекции штаммов ВКЭ сибирского генотипа с территории Новосибирского Академгородка на основании анализа маркерных аминокислот и филогенетических деревьев показало существенную разницу между результатами, полученными разными методами (Рис. 8А и Б). Так, штаммы 230, 323, 668, 1508, 2530 и 2730, содержащие в аминокислотной последовательности белка E нетипичную маркерную аминокислоту тирозин (Y), на основании филогенетического анализа были отнесены к подгруппам Заусаев (штаммы 230, 668, 2530 и 2730) и Васильченко (штаммы 323 и 1508).

Еще один из подходов к типированию штаммов ВКЭ, основанный на анализе аминокислотной последовательности белка E по отдельным позициям с последующим выделением в так называемые кластеры, был предложен Ковалевым с Мухачевой (Kovalev, Mukhacheva, 2013). На основании анализа 617 штаммов ВКЭ сибирского генотипа, авторы разделили штаммы вируса на 19 групп в соответствии с аминокислотными сигнатурами. Анализ данных по кластерному анализу показал, что штаммы

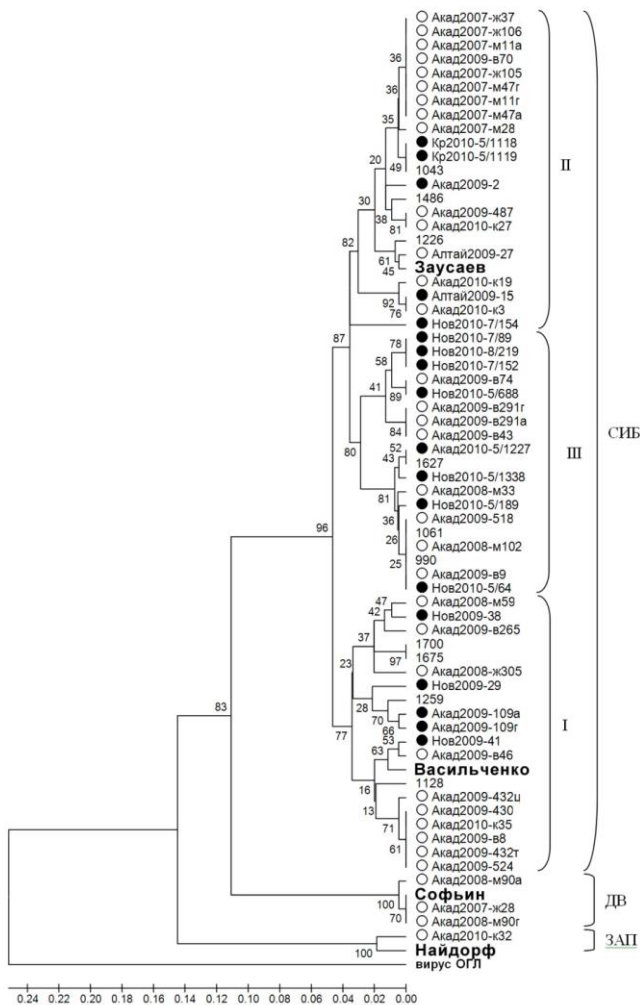


Рис. 6. Дендрограмма, построенная на основании нуклеотидных последовательностей фрагментов генов E и NS1 ВКЭ методом ближайших соседей. СИБ – сибирский генотип ВКЭ; ДВ – дальневосточный генотип ВКЭ; ЗАП – западноевропейский генотип ВКЭ. I – подтип Васильченко; II – подтип Заусаев; III – подтип, не описанный ранее. Белым кругом отмечены образцы ВКЭ из индивидуальных клещей, собранных флагованием; черным кругом отмечены образцы ВКЭ из индивидуальных клещей, собранных после укусов людей. Жирным выделены прототипные штаммы и внешняя группа – вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ).

| А. | | Б. | |
|-------------|---------------------|-------------|---------------------|
| | 175 | | 313 |
| Васильченко | KTIL T MGDYG | Васильченко | K F AWKRTPTD |
| Заусаев | | Заусаев | |
| Найдорф |E.. | Найдорф | .. T ...A... |
| Софьин | R..... | Софьин | .. T |
| Est54 | N | Est54 | .. T |
| Kokkola9 | N | Kokkola9 | .. T |
| 1528 (1999) | N | 1528 (1999) | |
| 1629 (1984) | N | 1629 (1984) | |
| 1130 (1995) | | 1130 (1995) | |

Рис. 7. Анализ маркерных аминокислот “балтийской” группы штаммов ВКЭ сибирского генотипа. А. По позиции 175 а.о. белка Е; Б. По позиции 313 а.о. белка Е.



Рис. 8. Соотношение различных генотипов штаммов ВКЭ в результате генотипирования различными методами. А – методом анализа маркерных аминокислот; Б – методом анализа филогенетических деревьев.

с территории ННЦ и его окрестностей в соответствии с аминокислотными сигнатурами были разделены на 7 кластеронов (Табл. 2), причем внутри самого представленного кластерона 3А выделяли подкластер 3А², соответствующий штаммам, найденным только в Западной Сибири и Среднем Урале (Kovalev, Mukhacheva, 2013). Тем не менее, 9 штаммов не могли быть отнесены ни к одному из описываемых кластеронов, и формировали группу из уникальных по сигнатурам штаммов. Сопоставление результатов кластеронного анализа и анализа филогенетических деревьев показало несоответствие результатов типирования штаммов. Так, прототипный для соответствующего субгенотипа штамм Васильченко был отнесен к отдельному кластеру 3Н, в то время как другие исследуемые штаммы, относящиеся к этому же субгенотипу, были отнесены к кластеронам 3А, 3А², 3Н, 3L, а также к группе штаммов с уникальными аминокислотными паттернами. Прототипный штамм Заусаев вошел в кластерон 3А, в то время

как другие представители этого субгенотипа вошли в кластероны 3А, 3С, 3V, а также в группу уникальных штаммов. Аналогичная ситуация наблюдалась и для штаммов субгенотипа III, найденного на территории Новосибирского Академгородка.

Таблица 2. Принадлежность штаммов ВКЭ сибирского генотипа с территории ННЦ и его окрестностей различным кластерам в соответствии с (Kovalev, Mukhacheva, 2013).

| Штамм | Кластерон | Субгенотип* | Штамм | Кластерон | Субгенотип* |
|----------------|-----------|-------------|--------------------|-----------|-------------|
| 101 | 3А | II | 1658 | 3А2 | I |
| 1189 | 3А | III | 1937 | 3А2 | I |
| 1284 | 3А | I | 2452 | 3А2 | I |
| 1427 | 3А | III | 2614 | 3А2 | I |
| 1486 | 3А | II | 348 | 3А2 | I |
| 1505 | 3А | II | 662 | 3А2 | I |
| 1526 | 3А | II | 755 | 3А2 | I |
| 1575 | 3А | III | 902 | 3А2 | I |
| 1577 | 3А | III | 745 | 3С | II |
| 1587 | 3А | III | 1128 | 3Н | I |
| 1618 | 3А | II | 942 | 3Н | I |
| 1620 | 3А | III | Васильченко | 3Н | I |
| 1627 | 3А | III | 1130 | 3К | III |
| 1636 | 3А | III | 1675 | 3L | I |
| 237 | 3А | III | 1699 | 3L | I |
| 2378 | 3А | III | 1700 | 3L | I |
| 2421 | 3А | III | 766 | 3N | III |
| 2432 | 3А | III | 2530 | 3V | II |
| 2444 | 3А | III | 2730 | 3V | II |
| 2453 | 3А | III | 1346 | 3Unique | I |
| 2574 | 3А | III | 1441 | 3Unique | III |
| 302 | 3А | II | 228 | 3Unique | II |
| 396 | 3А | II | 2401 | 3Unique | I |
| 969 | 3А | III | 323 | 3Unique | I |
| 983 | 3А | III | 499 | 3Unique | III |
| Заусаев | 3А | II | 668 | 3Unique | II |
| 1057 | 3А2 | I | 691 | 3Unique | II |
| 1446 | 3А2 | I | 919 | 3Unique | II |
| 1467 | 3А2 | I | | | |

* Субгенотипы определены на основании филогенетического анализа штаммов ВКЭ (Рис. 4). I – субгенотип Васильченко; II – субгенотип Заусаев; III – субгенотип III, неописанный ранее. Жирным отмечены прототипные штаммы генотипов ВКЭ.

5. Оценка возраста популяции ВКЭ на территории Новосибирского Академгородка

Для оценки гипотезы “молекулярных часов” (Kimura, 1968) для последовательности фрагмента гена E длиной 450 п.н. (275-724 н.о. от начала

гена E) исследуемых штаммов ВКЭ использовали программу Mega 5.05 (Tamura et al., 2011). Было показано, что нулевая гипотеза об одинаковой скорости эволюции для исследуемых последовательностей для всех ветвей филограммы не была отвергнута ($P < 0.99$).

Для определения скорости накопления мутаций в исследуемом фрагменте гена E, проводили расчеты в программе BEAST 1.7.4 методами Байесовской статистики и анализа Монте-Карло с использованием цепей Маркова (MCMC) (Drummond, Rambaut, 2007; Drummond et al., 2012). В качестве эволюционной модели использовали наиболее подходящую для имеющихся последовательностей обобщенную реверсивную модель (generalized time reversible) с учетом инвариантности сайтов (GTR+I), выбранную ранее при построении филограммы.

Для достижения рекомендованного авторами программы BEAST 1.7.4 статистически достоверного эффективного размера выборки (Effective Sample Size (ESS)) использовали 45 миллионов итераций. Было показано, что для фрагмента гена E длиной 450 н.о. (позиции 275-724 н.о.) средняя скорость замен по всем сайтам составляет $1,26 \pm 0,02 * 10^{-4}$ замен на сайт в год, что было сравнимо с оценками, проведенными другими авторами ранее (Suzuki, 2007; Kovalev et al, 2009) Анализ синонимичных замен позволил оценить скорость эволюции в $2,77 \pm 0,05 * 10^{-4}$ замен на сайт в год, что также было сравнимо с литературными данными (Hayasaka et al., 1999).

Определение скорости замен в изучаемом фрагменте генома позволило оценить возраст популяции ВКЭ на территории Новосибирского научного центра. С использованием программ BEAST 1.7.4 и FigTree 1.3.1 (Drummond, Rambaut, 2007; Drummond et al., 2012) была проведена оценка значения времени дивергенции каждой из трех выявленных групп внутри сибирского генотипа (Рис. 9). Было показано, что штаммы, соответствующие подгруппе I

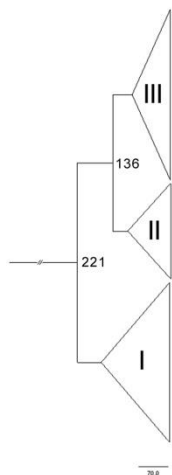


Рис. 9. Фрагмент хронограммы, построенной на основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E (275-724 н.о.) штаммов ВКЭ.

Прототипные штаммы, соответствующие европейскому и дальневосточному генотипам ВКЭ, группам штаммов “178-79” и “886-84”, а также внешняя группа (вирус ОГЛ) не показаны из-за существенной разницы в длине соответствующих веток хронограммы. Группы I-III соответствуют сибирскому генотипу; I – субгенотип Васильченко; II – субгенотип Заусаев; III – субгенотип, не описанный ранее. В узлах хронограммы приведены значения времени дивергенции в годах, оцененные с использованием программы BEAST 1.7.4 (Drummond, Rambaut, 2007; Drummond et al., 2012).

(субгенотипу Васильченко), дивергировали от общего предка наиболее рано (около 220 лет назад), в то время как подгруппы II (субгенотип Заусаев) и III разделились позже (около 135 лет назад).

6. Анализ генетических особенностей ВКЭ сибирского генотипа на территории Новосибирского Академгородка и других территориях Евразии

Было показано, что сибирский генотип ВКЭ распространен на всей территории Евразии (Злобин и др., 2003), поэтому следующий этап работы предполагал сравнение генетических особенностей вариантов ВКЭ сибирского генотипа, выявленных на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра и его окрестностей, с вирусами из других регионов, чьи последовательности представлены в базе данных GenBank.

Территория Урала является эндемичной для ВКЭ, с доминированием здесь сибирского генотипа вируса (Ковалев и др., 2008). Для сравнительного анализа были взяты последовательности фрагмента гена E изолятов сибирского генотипа ВКЭ, выявленных в иксодовых клещах, собранных в Североуральском районе Свердловской области в 2005 году, а также последовательности штаммов и изолятов ВКЭ, выделенных на территории Урала (Башкирия (n=1), Свердловская (n=167), Курганская (n=10), Челябинская (n=6) и Тюменская (n=20) области), представленные в базе данных GenBank. Анализ построенной филограммы на основании фрагмента гена E длиной 369 н.о. показал, что исследуемые штаммы и изоляты ВКЭ формируют 4 кластера внутри сибирского генотипа (рис. 10а) В кластер I (субгенотип Васильченко) не вошли ни один из штаммов или изолятов ВКЭ с территории Урала. Кластеры II (Заусаев) и III содержали 141 и 39 штаммов и изолятов ВКЭ с территории Урала, соответственно. Кластер IV был сформирован только 26 штаммами и изолятами, выделенными на территории Уральского региона.

Территории **Восточной Сибири** в пределах местообитания иксодовых клещей являются эндемичными для ВКЭ (Злобин и др., 2003). Для проведения сравнительного анализа были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов E-NS1 (длиной 341 н.о.) для 66 штаммов ВКЭ, выделенных на территории Восточной Сибири, из коллекции ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН г. Иркутск (любезно предоставленных Козловой И.В.) Анализ гомологии полученных последовательностей показал, что помимо штаммов, имеющих высокую степень гомологии с сибирским генотипом ВКЭ, на территории Восточной Сибири встречаются как штаммы дальневосточного, так и западного генотипа. Более того, был обнаружен ряд штаммов, относящихся к возможному новому генотипу, так называемой “группе 886-84” (Злобин и др., 2003).

Для дальнейшего анализа из полученных последовательностей были

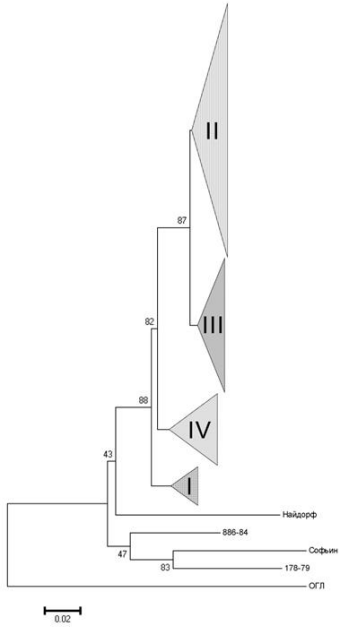
отобраны последовательности штаммов сибирского генотипа (n=47), а также 12 последовательностей штаммов ВКЭ, выделенных на территории Восточной Сибири из базы данных GenBank. Выравнивание последовательностей с последующим построением филограммы методом NJ, показало, что штаммы ВКЭ сибирского генотипа из Восточной Сибири разделяются на субгенотипы Васильченко (n=38) и Заусаев (n=21) (Рис. 10б), а к неопisanному ранее субгенотипу III, который был широко представлен штаммами ВКЭ из Западной Сибири, не относился ни один из штаммов с Восточной Сибири.

При анализе последовательностей фрагментов генов E-NS1 штаммов ВКЭ, выделенных на территории Восточной Сибири, были обнаружены штаммы, имеющие высокий уровень гомологии со штаммом 886-84, которые образовывали отдельную группу на филограмме (Рис. 11).

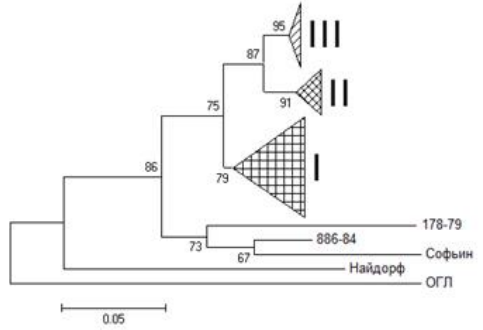
Ранее была расшифрована полногеномная последовательность прототипного штамма группы 886-84 (EF469662; KJ633033) (Карань и др., 2007). Т.к. на ее основании был сделан вывод о принадлежности данного штамма к группе штаммов сибирского генотипа (Kovalev, Mukhacheva, 2013), было необходимо определение полногеномных последовательностей других представителей штаммов данной группы. С использованием разработанной панели олигонуклеотидов были определены полногеномные последовательности для штаммов 617-90, 711-84 и 740-84. Сравнение уровней гомологии между различными генотипами ВКЭ и внутри каждого из генотипов, а также для штаммов группы “886-84” показало, что уровень различий штаммов “группы 886-84” и других генотипов составлял 12,5% и выше для нуклеотидных последовательностей кодирующей части генома, и 3,9% и выше для последовательностей полипротеина, что соответствовало критерию разделения ВКЭ на генотипы. Анализ полноразмерной последовательности полипротеинов изучаемых штаммов продемонстрировал, что по разным позициям наблюдаются аминокислотные остатки, характерные для различных генотипов ВКЭ. Более того, в полипротеине штаммов группы “886-84” были выявлены 29 уникальных замен, являющихся специфическими только для штаммов данной группы.

Северо-Западная часть Евразии (Скандинавия, Прибалтика, Северо-Западный федеральный округ России) также является эндемичной по ВКЭ (Katargina et al., 2013). Было показано, что помимо западноевропейского генотипа, на данных территориях выявляют и сибирский генотип ВКЭ (Golovljova et al., 2004; 2008). Для сравнительного анализа, в базе данных GenBank были выбраны последовательности штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на территории Северо-Западной части Евразии (n=20). На основании последовательностей фрагмента гена E ВКЭ (длиной 192 н.о.) методом NJ была построена филограмма (Рис. 10в). Среди исследуемых штаммов только один относился к субгенотипу Заусаев,

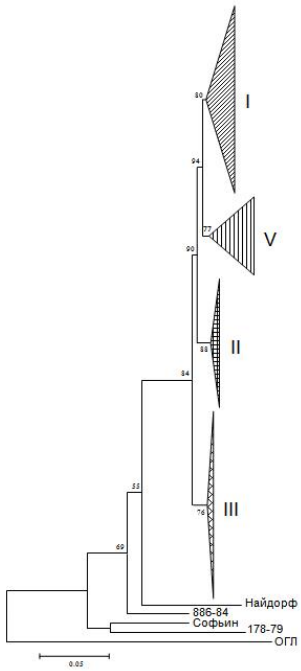
А



Б



В



Г

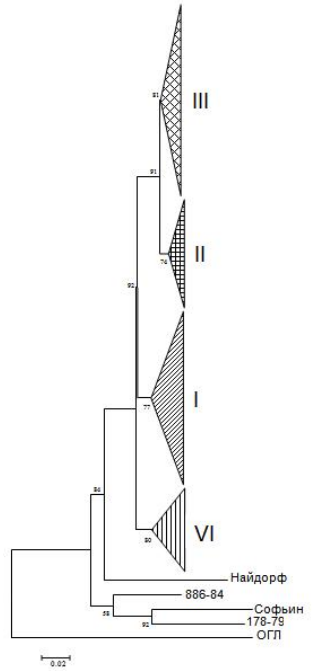


Рис. 10. Филограммы, построенные методом NJ на основании последовательностей фрагмента гена E штаммов ВКЭ сибирского генотипа. Сравнение проводилось для штаммов ВКЭ с территории Западной Сибири и а) Урала; б) Восточной Сибири; в) Северо-Западной части Евразии (Скандинавия, Прибалтика, Северо-Западный федеральный округ России); г) Европейской части России. Кластеры I-III - кластеры, содержащие штаммы с территории Новосибирского Академгородка: I – кластер Васильченко, II – кластер Заусаев, III – кластер штаммов Западной Сибири, не описанный ранее. IV – кластер, содержащий только штаммы ВКЭ с территории Урала. V – кластер штаммов “балтийской ветви” сибирского генотипа. VI – “европейский топовариант” сибирского генотипа.

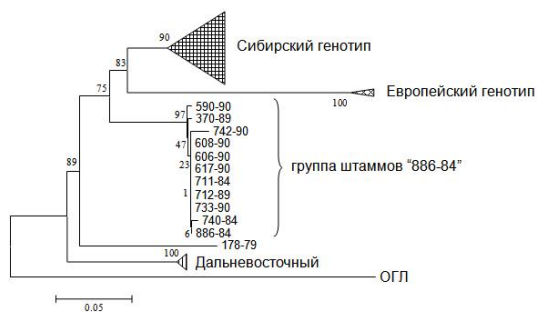


Рис. 11. Филограмма, построенная на основании последовательностей фрагментов генов E-NS1 (длиной 341 н.о.) штаммов ВКЭ, выделенных на территории Западной и Восточной Сибири, методом NJ.

остальные штаммы формировали отдельный кластер, описанный ранее как “балтийская ветвь” сибирского генотипа ВКЭ (кластер V) (Golovljova et al., 2004; 2008). Кластеры Васильченко (I) и III формировали только штаммы из Западной Сибири.

Вирус клещевого энцефалита также выявляется в **Европейской части России** (Лесникова и др., 2007). Для анализа, из базы данных GenBank были отобраны последовательности штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на европейской части России (n=30). На основании последовательностей фрагмента гена E (длиной 196 н.о.) методом NJ была построена филограмма (Рис. 10г). Было показано, что исследуемые штаммы с территории европейской части России преимущественно (n=27) формируют отдельный кластер внутри сибирского генотипа ВКЭ (“европейский топовариант”) (кластер VI), один штамм относился к субгенотипу Заусаев, два к кластеру III штаммов Западной Сибири, и ни один не относится к субгенотипу Васильченко.

Таким образом, данные, полученные при анализе филограмм, построенных с использованием последовательностей гена E штаммов ВКЭ из различных регионов Евразии, позволили оценить встречаемость различных субгенотипов сибирского генотипа ВКЭ (Табл. 3).

Таблица 3. Встречаемость различных субгенотипов сибирского генотипа ВКЭ на территории Евразии.

| Кластер (субгенотип) | Территория | | | | |
|------------------------------|------------------|---|------|--------------------------|---|
| | Восточная Сибирь | ННЦ и его окрестности (Западная Сибирь) | Урал | Европейская часть России | Скандинавия, Прибалтика, Северо-западный федеральный округ России |
| I (Васильченко) | + | + | - | - | - |
| II (Заусаев) | + | + | + | + | + |
| III (не описан ранее) | - | + | + | + | - |
| IV (не описан ранее) | - | - | + | - | - |
| V (“Балтийская ветвь”) | - | - | - | - | + |
| VI (Европейский топовариант) | - | - | - | + | - |

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что на территории Новосибирского Академгородка и в пригородах г. Новосибирска в иксодовых клещах доминирует сибирский генотип ВКЭ, внутри которого выделяются три субгенотипа – Васильченко, Заусаев и субгенотип III, неописанный ранее; дальневосточный и европейский генотипы выявляются в единичных случаях.

2) Оценка времени дивергенции субгенотипов сибирского генотипа ВКЭ, циркулирующего на территории Новосибирского Академгородка и окрестностей г. Новосибирска, показала, что штаммы, соответствующие субгенотипу Васильченко, дивергировали от общего предка около 220 лет назад, в то время как субгенотипы Заусаев и субгенотип, неописанный ранее, разделились позднее, около 135 лет назад.

3) Установлено, что сибирский генотип ВКЭ, циркулирующий на территории Евразии, обладает высокой генетической вариабельностью и может быть разделен на шесть субгенотипов, из которых субгенотип Заусаев широко представлен на всех исследуемых территориях Евразии; субгенотип Васильченко найден только на территории Восточной и Западной Сибири; новый субгенотип III найден только на территории Западной Сибири, Урала и Европейской части России.

4) Показано, что штаммы “группы 886-84” ВКЭ, выделенные на территории Восточной Сибири, на основании уровня нуклеотидных замен в геномах (12,5% и выше), соответствующего критерию разделения ВКЭ на генотипы, являются потенциально новым генотипом вируса.

Список основных публикаций по теме диссертации

- 1) В.Н. Бахвалова, В.А. Рар, **С.Е. Ткачев**, Е.Ю. Добрикова, О.В. Морозова. Генетический анализ штаммов вируса клещевого энцефалита Западной Сибири // Вопросы вирусологии. – 2000. - №5. С. 11-13.
- 2) Bakhvalova V.N., Dobrotvorsky A.K., Rar V.A., **Tkachev S.E.**, Matveev V.A., Matveev L.E., Karavanov A.S., Morozova O.V. Tick-borne encephalitis virus strains of Western Siberia // Virus Research. - 2000. - Т. 70. - № 1-2. - С. 1 - 12.
- 3) **Ткачев С.Е.**, Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г. Исследование генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита сибирского генетического типа, выявленного в клещах *Ixodes persulcatus* на Северном Урале в 2006 году // Бюллетень СО РАМН. - 2007. - №4. - С. 49-52.
- 4) **S.E. Tkachev**, N.V. Fomenko, V.A. Rar, Y.P. Igolkina, Y.V. Kazakova, N.Y. Chernousova. PCR-detection and molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens in patients of Novosibirsk region, Russia. - International Journal of Medical Microbiology // 2008. - V. 298, S1. - P. 365-367.
- 5) Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhovina M.M., Kozlova I.V., **Tkachev S.E.**, Plyusnin A., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Zlobin V.I. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. // J. Med. Virol. - 2010. V. 82, № 6, P. 965-976.
- 6) **Ткачев С.Е.**, Боргояков В.Ю., Ливанова Н.Н., Панов В.В. Встречаемость генетических типов и подтипов вируса клещевого энцефалита на территории Новосибирского научного центра // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - № 4. - С. 41-44.
- 7) И.В. Козлова, М.М. Верхозина, Т.В. Демина, Ю.П. Джиоев, **С.Е. Ткачев**, Л.С. Карань, Е.К. Дорошенко, О.В. Лисак, О.В. Сунцова, А.И. Парамонов, О.О. Черноиванова, А.О. Ревизор, В.И. Злобин. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующей в Восточной Сибири // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - Т. 3, № 64. - С. 14-25.
- 8) Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М., Демина Т.В., Рар В.А., **Ткачев С.Е.**, Фоменко Н.В., Сунцова О.В., Черноиванова О.О., Парамонов А.И., Ревизор А.О., Злобин В.И. Видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. - № 2, ч.2. - С. 75-82.