

Т.В. Демина, Ю.П. Джиев, М.М. Верхозина, И.В. Козлова, Е.К. Дорощенко, О.В. Лисак,
Е.Г. Протасова, В.И. Злобин¹

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ПОМОЩЬЮ ЗОНДИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Институт эпидемиологии и микробиологии ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)
¹ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва)

Создана новая панель молекулярных зондов, предназначенная для индикации и дифференциации вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) методом биочипов. Она состоит из зондов, мишенью для которых послужили все десять генов ВКЭ. С помощью этой панели методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) исследовано 268 музейных штаммов ВКЭ. Установлена генотипическая принадлежность каждого тестируемого штамма. Результаты типирования соответствуют сложившейся молекулярно-биологической концепции о существовании трех основных генотипов ВКЭ. Выявлены субгенотипспецифические особенности популяций ВКЭ.

Ключевые слова: биочиповая панель, дезоксиолигонуклеотидные зонды, генотипы ВКЭ

**T.V. Demina, Yu.P. Dzhioev, M.M. Verkhovina, I.V. Kozlova, E.K. Doroshenko, O.V. Lisak,
E.G. Protasova, V.I. Zlobin¹**

STUDY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS BY THE METHOD OF MOLECULAR HYBRIDIZATION OF NUCLEIC ACIDS

Institute of Epidemiology and Microbiology SC ME ESSC SB RAMN, Irkutsk
¹*Institute of Virology RAMN, Moscow*

The new panel of molecular probes intended for indication and differentiation of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) by a method of biochips is created. It consists of probes, as a target for which all ten genes of the virus have served. With the help of this panel by a method of molecular hybridization of the nucleic acids is investigated 268 museum strains of TBEV. Genotypical belonging of everyone tested strain is established. The results of genotypical determination correspond to the usual molecular-biological concept about existence of three basic genotypes TBEV. Subgenotypical peculiarities of TBEV populations are revealed.

Key words: DNA microarrays, deoxioligonucleotide probes, genotypes of TBEV

Ранее нами был сделан вывод о том, что наиболее полную картину генетической variability штаммов ВКЭ дает определение первичной структуры неконсервативных участков генома [1, 2]. На основе сравнения фрагментов гена E ВКЭ длиной 160 н.о. было установлено наличие шести генетических вариантов вируса. Три из них в настоящее время имеют общепризнанное эпидемиологическое значение: дальневосточный, западный (европейский) и урало-сибирский (сибирский) [4]. Постоянно пополняющиеся данные GenBank не противоречат этой молекулярно-биологической концепции. Анализ предыдущих опытов с использованием МГНК, а так же полногеномных нуклеотидных последовательностей и их фрагментов, позволяет прийти к заключению о целесообразности дальнейшего изучения генетической variability ВКЭ с помощью МГНК.

Цель данного исследования — апробация биочиповой системы для диагностики клещевого энцефалита и молекулярно-эпидемиологического мониторинга его возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемая биочиповая панель включает 40 дезоксиолигонуклеотидных последовательностей — зондов, мишенью для которых послужили все десять генов ВКЭ (рис. 1). Из них: одна последовательность

видоспецифична — зонд ш5, ранее описанный в литературе [4]; тридцать шесть являются генотипспецифическими — по 12 на каждый из трех генотипов (по одному зонду на гены M, C, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и по два — на гены E и NS5); два зонда субгенотипспецифичны — дифференцируют штаммы внутри генотипа 3 (предполагаемые субтипы «Айна» и «Заусаев») и один зонд является штаммоспецифичным (сконструирован на основе штамма 178-79).

С помощью этой панели методом МГНК [6] исследовано 268 музейных штаммов из евроазиатского ареала ВКЭ, собранных за период с 1973 по 2006 гг. и хранящихся в музейной коллекции Иркутского ИЭМ. В составе выборки 151 штамм из Байкальского региона (Читинская область, Республика Бурятия, Иркутская область, Усть-Ордынский Бурятский автономный округ) и 117 — с остальной территории ареала, куда вошли Дальний Восток (15 шт.), Красноярский край и Республика Хакасия (15), Западная Сибирь (24), Урал (23), Центральная и Северо-западная Россия (20), Восточная Европа (18) и Центральная Азия (2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что 18,3 % выборки приходится на генотип 1 (49 штаммов), 7,8 % — на генотип 2 (21) и 73,9 % — на генотип 3 (198). Уточненное

географическое распределение генотипов ВКЭ согласуется с ранее полученными данными. Наибольшая межштаммовая вариабельность отмечается в группе генотипа 3 (урало-сибирский) – только 12 % образцов РНК из нее имеют высокий процент гомологии по исследованным участкам генома (РНК этих штаммов реагирует более чем с 90 % соответствующих генотипспецифичных зондов), в то время как для групп генотипов 1 (дальневосточный) и 2 (западный) эти показатели составляют 47 и 43 % соответственно.

Генотипический состав ВКЭ Байкальского региона (19,2 % штаммов генотипа 1, 3,3 % – генотипа 2 и 77,5 % – генотипа 3) соответствует картине, характерной для всего обследуемого ареала

(рис. 2). Наблюдается лишь небольшое перераспределение между генотипами 2 и 3 – чуть меньше 5 % популяционного состава на территории Байкальского региона переходит от генотипа 2 к генотипу 3. Восточную часть ареала (Дальний Восток) в нашей подборке штаммов делят между собой почти поровну дальневосточный (53 %) и урало-сибирский генотипы (47 %).

Всю территорию западнее Байкальского региона занимают 14 % штаммов генотипа 1, 18,6 % – генотипа 2 и 67,4 % – генотипа 3.

При сравнении распределения субгенотипов генотипа 3 по всему ареалу и по Байкальскому региону, выявляется определенное соотношение: примерно по четверти (от 22 до 25 % штаммов ура-

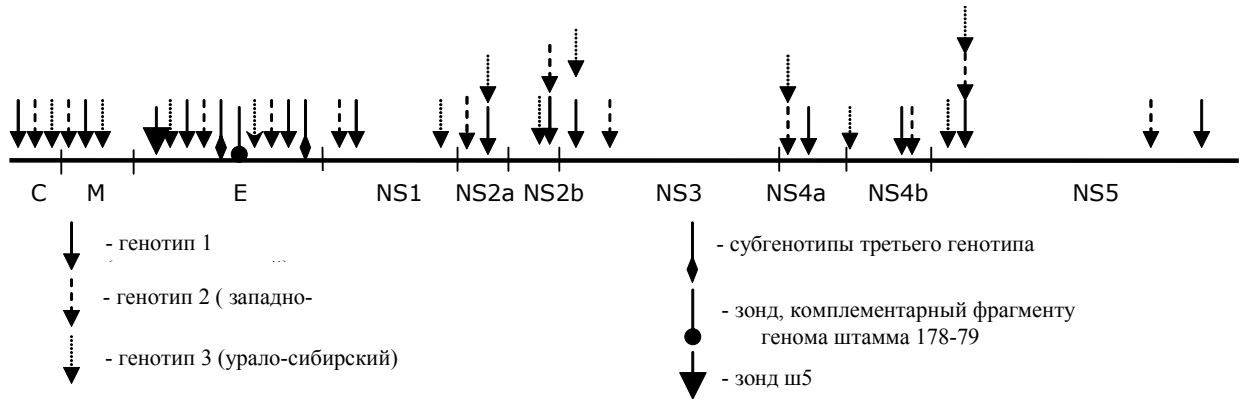


Рис. 1. Расположение дезоксиолигонуклеотидных зондов на геноме вируса клещевого энцефалита.

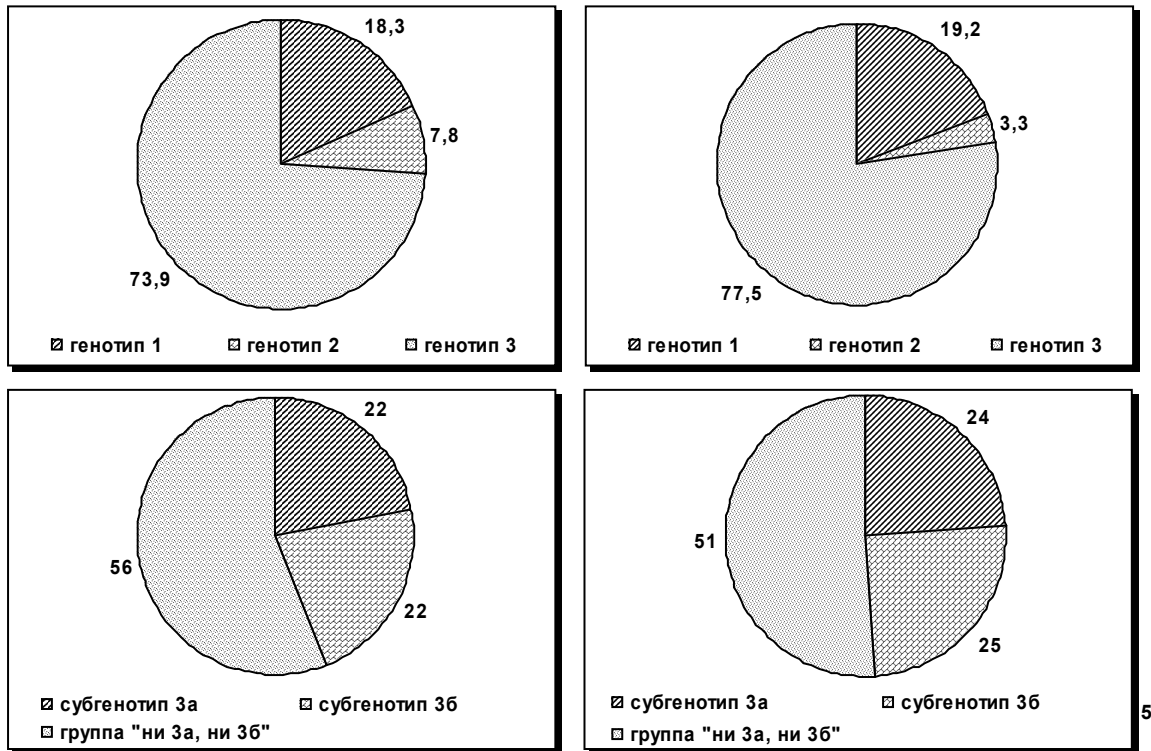


Рис. 2. Соотношения генотипов (а, в) и субгенотипов (б, г) третьего генотипа вируса КЭ на территориях всего ареала и Байкальского региона по результатам типирования 268 штаммов с помощью панелей генотипспецифических дезоксиолигонуклеотидных зондов.

ло-сибирского генотипа) приходится на субгенотипы «Айна» (субгенотип 3а) и «Заусаев» (субгенотип 3б) и остальное — на группу «ни 3а, ни 3б» (рис. 2). Вместе с тем, по разным очагам ареала наблюдается «нарушение» этого соотношения. Так, например, в Красноярском крае (заповедник «Столбы»), Республике Хакасия, Республика Бурятия доминируют вирусные популяции из группы «ни 3а, ни 3б»; в Зиминском районе Иркутской области (окрестности г. Саянска) — 3б, а в отдельных очагах Иркутского района Иркутской области (тракты Байкальский и Голоустинский) — 3а.

В Байкальском регионе обнаружены очаги, в которых циркулируют штаммы генотипа 1 с гомологией исследуемых участков генома от 100 до 42 %, как и по всему ареалу, а также выявлена очаговая популяция, содержащая штаммы, идентифицированные как дальневосточная группа с 25 % гомологией.

Гетерогенность выявлена и среди штаммов генотипа 2. Например, у всех пяти изолятов этой группы, выделенных в Байкальском регионе, отмечается своеобразие в зависимости от места изоляции и вида хозяина при гомологии от 75 до 58 %, тогда как по всему ареалу гомология изолятов западного генотипа составляет не менее 50 %.

Своеобразие генотипического и субгенотипического состава, проявляющееся в доминировании или отсутствии определенных паттернов гибридизации, выявлено в каждом очаге. Так, в Байкальском регионе особый интерес представляют Эхирит-Булагатский район (в составе Усть-Ордынского Бурятского автономного округа) и Бичурский район (Республика Бурятия).

На территории Эхирит-Булагатского района циркулируют представители всех трех генотипов и разных субгенотипов (исследовано всего 17 штаммов), в том числе уникальный штамм 178-79 — единственный штамм из всей выборки, прореагировавший с зондом, сконструированным на его основе (все три образца РНК штамма реагировали идентично). Все образцы РНК генотипа 1, за исключением штамма 178-79, прореагировали с соответствующими зондами на гены NS3 и NS5 и, одновременно, он, единственный из штаммов генотипа 1, прореагировал с зондом генотипа 2 на ген NS5.

На территории Бичурского района исследовано 8 штаммов, изолированных в разное время. 7 из них идентифицированы как дальневосточная группа с необычной картиной гибридизации (25 % гомологии с первым генотипом по исследованным участкам генома). Стоит отметить, что идентичные паттерны гибридизации обнаружены также у двух штаммов из Читинской области.

Предварительный анализ опытов показал:

- ✦ за редким исключением, генотипспецифичные зонды реагируют с РНК штаммов соответствующего генотипа;

- ✦ зонды двух субгенотипов генотипа 3 реагируют только со штаммами генотипа 3, причем со-

отношения субгенотипов меняются в зависимости от региона обитания популяции вируса;

- ✦ зонд на штамм 178-79 реагирует только с РНК одноименного штамма;

- ✦ полученные результаты совпадают с данными по расшифровке первичных структур геномов и позволяют детализировать межштаммовые отличия внутри генотипов.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итогом представленного исследования является то, что абсолютно все штаммы ВКЭ, протестированные с помощью новой панели дезоксирибонуклеотидных зондов, генотипированы, а результаты типирования соответствуют сложившейся молекулярно-биологической концепции о существовании трех основных генотипов ВКЭ (рис. 3).

Получена панорамная информация о генетической гетерогенности возбудителя КЭ по всему обследованному ареалу, проявляющая субгенотипспецифичные особенности популяций ВКЭ. Так, наибольшим разнообразием отличается очаг в Эхирит-Булагатском районе — в подборке из 17 штаммов, изолированных в нем, оказались представители всех трех генотипов и субгенотипов. Особый интерес представляет генотип штамма 178-79 из этого же очага. Впервые его необычность выявлена при расшифровке фрагмента гена Е длиной 160 н.о. [1, 2]. Максимальная гомология последовательностей была отмечена с дальневосточным прототипом генотипа 1 (шт. Софьин — 87 и до 84 % с другими представителями генотипа 1), минимальная — 80 % — с представителями генотипов 2 и 3. Позднее штамм 178-79 отнесли к генотипу 1, поскольку по нуклеотидному составу он оказался ближе всего к штаммам данного генотипа, и не было обнаружено других подобных ему штаммов [4]. В настоящем исследовании также проявилось своеобразие этого штамма в виде нетипичной для генотипа 1 картины гибридизации. На гомологичном зонду участке объединены одиночные «случайные» замены, характерные для отдельных штаммов генотипов 2 и 3, которые, вероятно, сформировали новую устойчивую нуклеотидную комбинацию. К настоящему времени известно более 100 расшифрованных нуклеотидных последовательностей, перекрывающих этот участок, но штаммов, аналогичных штамму 178-79, не выявлено.

Необычное реагирование образцов РНК из Бичурского района Бурятии и из Читинской области с новыми олигонуклеотидными зондами, по нашему мнению, может явиться достаточным основанием для полногеномного секвенирования одного из них. К тому же, в литературе имеется описание тяжелых клинических случаев КЭ в этих очагах [3, 5, 7, 8].

Сопоставимость генотипических картин всего обследованного ареала с генетической структурой штаммов Байкальского региона (рис. 2), возможно объясняется достаточной представительностью региональной выборки, его расположением в центральной части ареала, характери-

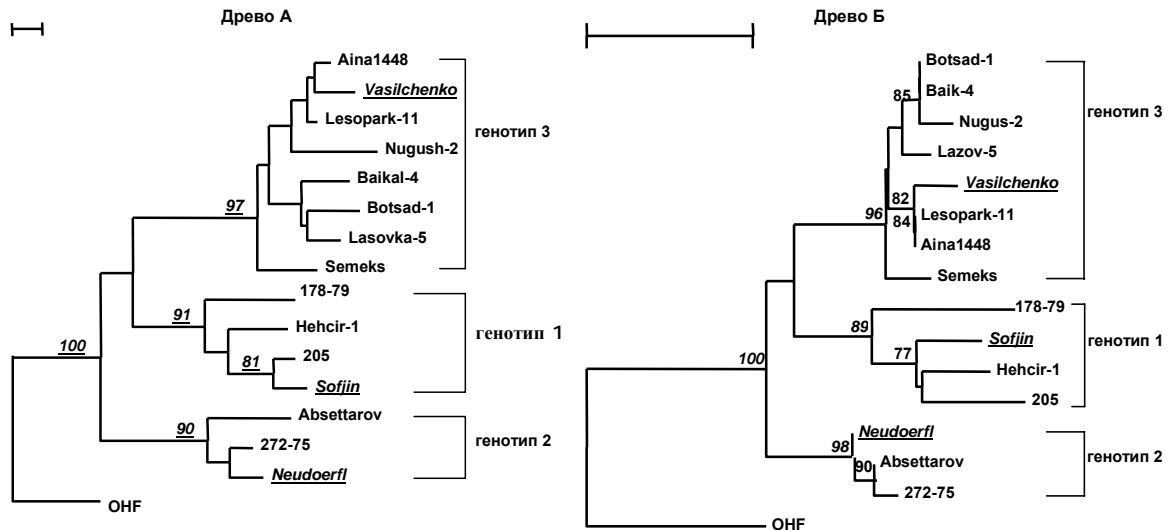


Рис. 3. Деревья генетического родства 16 штаммов вируса КЭ, построенные с помощью программы TREECON. Древо А получено по результатам гибридационных тестов с 40 дезоксиолигонуклеотидными зондами (данные настоящей работы). Древо Б – результат обработки данных по расшифровке фрагмента гена Е длиной 160 н.о. (по [1]). Курсивом с подчеркиванием выделены прототипные штаммы генотипов ВКЭ.

зующейся наличием множества своеобразных и разнообразных ландшафтов. Своеобразия ландшафтов обуславливают в очагах ВКЭ разнообразие климатических условий, видовых составов переносчиков и позвоночных хозяев и могут быть причиной высокой генетической гетерогенности возбудителя КЭ.

Возникает вопрос: насколько представленная панорамная информация по гетерогенности вируса, полученная в нашем исследовании, соответствует общей ситуации по всему ареалу к настоящему моменту, учитывая, что штаммы собраны в разное время (с 1937 по 2006 гг.), в разных очагах, из разных источников и т.д. Сейчас однозначно ответить на этот вопрос сложно. Но складывается впечатление, что интервал времени в 70 лет с момента открытия вируса оказался «спокойным» периодом в истории его эволюции. Во всяком случае, в масштабах всего ареала и в разное время наблюдается циркуляция достаточно стабильного набора генетических вариантов ВКЭ. Предложенный способ генотипирования позволит оценить пространственно-временные особенности отдельных очагов разного уровня. Для этого нужно расширить подборку тестируемых изолятов, и в первую очередь, за счет музейных штаммов.

Анализ результатов данного исследования не завершен – идет поиск оптимальных способов обработки информации.

Полагаем, что новая панель из дезоксиолигонуклеотидных зондов для скрининга геномов ВКЭ пригодна как для диагностических, так и для исследовательских целей, поскольку предлагаемый инструмент позволяет расширить наши представления о генетических, экологических, географических, популяционных и других особенностях возбудителя КЭ.

Авторы выражают благодарность Департаменту инновационной деятельности, науки и высшей школы Иркутской области. Работа выполнена при поддержке из областного инновационного проекта по биочипам (№ 05-50-392/6).

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е / В.И. Злобин, Т.В. Демина, Л.В. Мамаев, Т.В. Бутина и др. // *Вопр. вирусол.* – 2001. – № 1. – С. 12–16.
2. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки / В.И. Злобин, Т.В. Демина, С.И. Беликов, Т.В. Бутина и др. // *Вопр. вирусол.* – 2001. – № 1. – С. 16–21.
3. Лохов М.Г. К структурно-функциональной характеристике очагов клещевого энцефалита в Бичурском районе Бурятской АССР / М.Г. Лохов, И.А. Блиникова // *Сб. науч. тр.* – Иркутск: Иркутский мединститут. – 1986. – С. 44–52.
4. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В.И. Злобин, С.И. Беликов, Ю.П. Джоиев, Т.В. Демина и др. // *Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита.* – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН. – 2003. – 271 с.
5. Ситуация по клещевому энцефалиту на западе Читинской области / О.З. Горин, Н.П. Мунгалова, В.А. Леонов, Б.Е. Созанский и др. // *Этиология, эпидемиология и диагностика инфекционных заболеваний Восточной Сибири: Сб. науч. работ ИЭМ СО РАМН к 80-летию.* – Иркутск, 1992. – С. 44–53.
6. Шаманин В.А. Применение молекулярной гибридации с синтетическими дезоксиолигонуклеотидами для дифференциации штаммов ви-

руса клещевого энцефалита / В.А. Шаманин, А.Г. Плетнев, В.И. Злобин // Вопр. вирусол. — 1990. — Т. 35, № 6. — С. 474—478.

7. Шасаитов Ш.Ш. К вопросу о клещевом энцефалите в Читинской области / Ш.Ш. Шасаитов, Ю.А. Домаев // Влияние природно-климатических факторов на функциональное состояние чело-

века: Тез. докл. зональн. конф. МЗ РСФСР. — Чита, 1980. — С. 97—99.

8. Этиология очаговых форм клещевого энцефалита с летальными исходами в Читинской области / Е.И. Андаев, А.Г. Трухина, Л.С. Карань, В.В. Погодина и др. // Медицинская вирусология. — М., 2006. — Т. XXIII. — С. 75—77.