

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ ИЗ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ И ИЗ ВОСТОЧНОЙ И СЕВЕРНОЙ ЕВРОПЫ

Козлова И.В.¹,
Сунцова О.В.¹,
Ткачёв С.Е.²,
Парамонов А.И.¹,
Дорощенко Е.К.¹,
Лисак О.В.¹,
Охотина Ю.С.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции
человека» (664003, г. Иркутск,
ул. Тимирязева, 16, Россия)

² Институт фундаментальной
медицины и биологии,
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» (420012,
г. Казань, ул. К. Маркса, 74, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Козлова Ирина Валерьевна,
e-mail: diwerhoz@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Изоляцией штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа (ВКЭ-Евр) от больных людей было доказано, что в Сибири он участвует в региональной инфекционной патологии и вызывает клиническую картину, сходную с западным КЭ. Однако сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-Евр, выделенных от людей больных КЭ в Восточной Сибири и в Европе, не проводился.

Цель исследования. Сравнительное исследование генома и поиск детерминант вирулентности у штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных людей из Восточной Сибири и Европы.

Материалы и методы. В работе использован штамм 1G-98 ВКЭ-Евр из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (GenBank № KY069119). В анализ также включены все полногеномные последовательности штаммов ВКЭ-Евр от людей, депонированные в GenBank на момент начала исследований. Секвенирование генома штамма 1G-98 проведено по методу Сэнгера. Получена характеристика вирулентности штамма при внутримозговом и подкожном заражении лабораторных мышей.

Результаты. Показано, что по кодирующей области генома уровень различий штаммов ВКЭ-Евр из Сибири не превышает установленный ранее максимальный для данного субтипа показатель в 3,1 %. Установлено, что штамм 1G-98, выделенный из крови больного КЭ из Иркутской области, характеризуется высокими показателями церебральной и периферической активности. У него выявлена мутация D67G в домене DII белка E, которая потенциально может быть ассоциирована с вирулентностью, обнаружена протяжённая делеция в вариабельной части 3'-некодирующей области генома, сопоставимая по длине с высоковирулентным штаммом Нург из Европы. **Заключение.** Впервые осуществлён сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-Евр от больных людей из азиатской части России и Европы, показавший их генетическое сходство, выявлены потенциальные детерминанты вирулентности.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, европейский субтип, геном, аминокислотная последовательность, детерминанты вирулентности

Для цитирования: Козлова И.В., Сунцова О.В., Ткачев С.Е., Парамонов А.И., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Охотина Ю.С. Сравнительный анализ штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, изолированных от больных людей из Восточной Сибири и из Восточной и Северной Европы. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 122-134. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.13

Статья поступила: 15.07.2024

Статья принята: 18.10.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

COMPARATIVE ANALYSIS OF EUROPEAN SUBTYPE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS FROM EASTERN SIBERIA AND EASTERN AND NORTHERN EUROPE

Kozlova I.V.¹,
Suntsova O.V.¹,
Tkachev S.E.²,
Paramonov A.I.¹,
Doroschenko E.K.¹,
Lisak O.V.¹,
Okhotina Yu.S.¹

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str., 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

² Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University (Karla Marksa str., 74, Kazan 420012, Russian Federation)

Corresponding author:
Irina V. Kozlova,
e-mail: diwerhoz@rambler.ru

ABSTRACT

Background. Isolation of strains from tick-borne encephalitis (TBE) patients proved that the European subtype tick-borne encephalitis virus (TBEV-Eur) in Siberia is involved in regional human infectious pathology and causes a clinical picture similar to Western TBE. However, a comparative analysis of the genomes of TBEV-Eur strains isolated from TBE patients in Eastern Siberia and Europe has not been carried out.

The aim. Genome comparative analysis and search for virulence determinants in TBEV-Eur strains isolated from patients in Eastern Siberia and Northern and Eastern Europe.

Materials and methods. In current work, TBEV-Eur strain 1G-98 from the collection of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (GenBank Acc. No. KY069119) was used. The analysis also included all complete genome sequences of TBEV-Eur strains from patients submitted in GenBank database at the time the study began. Complete genome sequencing of strain 1G-98 was performed using the Sanger method. The virulence of the strain was assessed by intracerebral and subcutaneous infection of laboratory mice.

Results. It has been shown that, according to the coding region of the genomes, the level of differences between TBEV-Eur strains from Siberia does not exceed the previously established maximum for this subtype of 3.1 %. The strain 1G-98, isolated from the blood of TBE patient from the Irkutsk region demonstrated high cerebral and peripheral activity. In this strain, D67G mutation in E protein DII domain was revealed, which could potentially be associated with virulence, and a long deletion in the variable part of the 3'-noncoding genome region, comparable in length to the highly virulent strain Hypr from Europe was found.

Conclusions. For the first time, a comparative analysis of the genomes of TBEV-Eur strains from TBE patients from the Asian part of Russia and Europe was carried out showing their genetic similarity, and potential virulence determinants were identified.

Key words: tick-borne encephalitis virus, European subtype, genome, amino acid sequence, virulence determinants

Received: 15.07.2024
Accepted: 18.10.2024
Published: 22.11.2024

For citation: Kozlova I.V., Suntsova O.V., Tkachev S.E., Paramonov A.I., Doroschenko E.K., Lisak O.V., Okhotina Yu.S. Comparative analysis of European subtype tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients from Eastern Siberia and Eastern and Northern Europe. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 122-134. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.13

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее значимых природно-очаговых вирусных инфекций, передающихся через укус иксодовых клещей. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который в соответствии с изменениями, внесёнными Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) в марте 2023 г., переименован в *Orthoflavivirus encephalitis* [1]. Нозоареал КЭ включает большую часть территории России, а также 29 стран Европы. Кроме того, случаи заболевания КЭ или вирусной активности регистрируются в 6 азиатских странах [2], а в 2021 г. ВКЭ впервые изолирован от клещей *Ixodes ricinus* на территории Африканского континента (Тунис) [3]. В настоящее время выделяют три основных субтипа ВКЭ – европейский (ВКЭ-Евр), сибирский (ВКЭ-Сиб) и дальневосточный (ВКЭ-ДВ). В последние годы описано ещё два предполагаемых субтипа ВКЭ – Байкальский (ВКЭ-Байк) [4, 5] и Гималайский (ВКЭ-Гим) [6]. ВКЭ-Евр доминирует в Европе, тогда как ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ чаще встречаются в Азии. Однако существуют территории, где одновременно встречаются два или даже три основных субтипа вируса. Одной из таких территорий является Восточная Сибирь, где обнаружены все известные на сегодняшний день субтипы ВКЭ, включая ВКЭ-Байк, за исключением ВКЭ-Гим [7].

КЭ отличается значительной вариабельностью клинического течения заболевания от инapparантной формы инфекции до тяжёлых форм с поражением центральной нервной системы. Клинические проявления КЭ во многом определяются свойствами возбудителя и особенностями реагирования иммунной системы человека. ВКЭ-Евр, как правило, вызывает заболевание с более мягким течением и благоприятным исходом, по сравнению с КЭ, вызванным ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ [8]. Для него характерно двухфазное течение, которое наблюдается у 74–85 % пациентов, инфицированных ВКЭ-Евр. Клиническая картина инфекции в Европе варьирует от субклинической до случаев КЭ с поражением ЦНС с тяжёлыми и сохраняющимися после заболевания неврологическими последствиями (до 10 % случаев). Показатель летальности от ВКЭ-Евр, как правило, не выше 2 % [8, 9]. Для западного КЭ нехарактерны геморрагические и хронические (прогрессирующие) формы заболевания, которые обычно ассоциируют с другими субтипами вируса. Летальные случаи КЭ, в основном, наблюдаются у пациентов с ослабленным иммунитетом или у пожилых людей [8].

Изоляцией штаммов от людей, больных КЭ, было доказано, что ВКЭ-Евр в Сибири участвует в региональной инфекционной патологии человека и вызывает клиническую картину, сходную с КЭ, регистрируемым на территории Европы [2, 10]. Однако сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-Евр, выделенных от больных КЭ людей в Восточной Сибири и в Европе, ранее не проводился.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение сравнительного анализа и поиск детерминант вирулентности у штаммов вируса клеще-

вого энцефалита европейского субтипа, изолированных от больных людей в Восточной Сибири и Северной и Восточной Европе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован штамм 1G-98 ВКЭ-Евр из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (№ 478258 скр.rf.ru), который был изолирован в 1998 г. из сгустка крови больного, пострадавшего от укуса таёжного клеща на территории Иркутской области. Определённая нами полногеномная последовательность этого штамма депонирована в базу данных GenBank под № KY069119. В анализ полных геномов штаммов мы также включили последовательности штаммов 214-67 (MK562430) и 172-68 (MK562446) из коллекции ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, которые были изолированы из ликвора больных на территории Иркутской области. Кроме того, из базы данных GenBank в анализ были взяты полногеномные последовательности штаммов ВКЭ-Евр: Absettarov (KU885457) (Россия); Skrivane (KJ922514), Hypr (U392292), Tobrman (KJ22515), Petraco (KJ922513), Kubinova (KJ922512), Vlasaty (KJ922516) (Чешская Республика); Kuutsalo-2015 (MG589937) (Финляндия); Ljubljana-1 (JQ654701) (Словения); 93/783 (MT581212) (Швеция).

Для накопления вируса готовили суспензию из лиофилизированных штаммов в разведении 10^{-3} с применением среды Игла MEM, 2%-й сыворотки КРС и антибиотиков (200 Ед/мл) и проводили заражение сосунков нелинейных белых мышей (0,03 мл – интрацеребрально). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977), а также в соответствии с Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986). Выполнение экспериментальных исследований на лабораторных животных одобрено комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Выписка из протокола № 6.1 от 20.11.2017). Для экстракции РНК готовили 10 % суспензии головного мозга мышей, инфицированных штаммом 1G-98 ВКЭ-Евр, центрифугировали их при 300 g в течение 15 мин, 100 мкл супернатанта суспензии использовали для экстракции РНК с помощью набора реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Reverta L-100, содержащего рандомизированные гексануклеотиды («АмплиСенс», Россия). ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, согласно инструкциям производителя набора реагентов для определения РНК ВКЭ в биологическом материале, методом двухраундовой ПЦР («BioSan», Россия) с 3 мкл кДНК и парой соответствующих праймеров, как было описано нами ранее [11]. Для полногеномного секвенирования использовали на-

боры ПЦР-фрагментов разной длины (298–693 п.н.), соответствующих определённым фрагментам генома ВКЭ и перекрывающихся друг с другом на 50–100 п.н. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных с помощью колонок GFX («Amersham Biosciences», США), определяли с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3100 («Applied Biosystems», США). Сборку последовательностей ПЦР-фрагментов в полногеномные и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 6.0 [12]. Филогенетический анализ выполняли методом байесовского анализа Монте-Карло с использованием цепей Маркова (Bayesian Markov chain Monte-Carlo method) в пакете программ BEAST v.1.10.4 [13, 14]. Оценку достоверности построенных деревьев проводили с помощью показателя апостериорной вероятности. Биоинформационный анализ и графическое представление расположения аминокислотных замен в белках штаммов ВКЭ-Евр из Восточной Сибири проводили в соответствии с описанием в статье Р. Formanova et al. [15]. Для визуализации структуры белка Е ВКЭ использовали структуру 1SVB из базы данных белков RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) [16]. Структуры белков NS1, NS3 и NS5 моделировали на сервере Phyre2 [17] в соответствии со структурами 4O6C [18], 2VBC [19] и 4K6M [20] из базы RCSB PDB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К моменту начала проводимых исследований (2021 г.) в базе данных GenBank находилось десять полногеномных последовательностей ВКЭ-Евр, изолированных от больных КЭ людей. Изучаемые штаммы были изолированы на территории СССР, Чешской Республики, Словении и Финляндии в период с 1953 по 2015 г. Кластеризация штаммов ВКЭ-Евр, выделенных от больных КЭ людей, показана на дендрограмме (рис. 1).

Штамм 1G-98 из нашей коллекции был изолирован из сгустка крови больного, пострадавшего от укуса таёжного клеща на территории Иркутской области (17 км Байкальского тракта), в 1998 г. Генетически наиболее близким к нему оказался штамм *Absettarov*. Этот штамм изолирован из крови 3-летнего мальчика с двухфазной лихорадкой и признаками менингита в 1951 г. в Ленинградской области. Несмотря на то, что штаммы 1G-98 и *Absettarov* были выделены от больных КЭ людей в разных точках России (Иркутская и Ленинградская области) с разрывом более чем в 40 лет, на дендрограмме они сформировали общую кладу (степень апостериорной вероятности – 100 %). Уровень гомологии последовательностей кодирующей части генома этих штаммов составил 98,32 %. При этом уровень сходства последовательностей по данной части генома штаммов *Skrivanek*

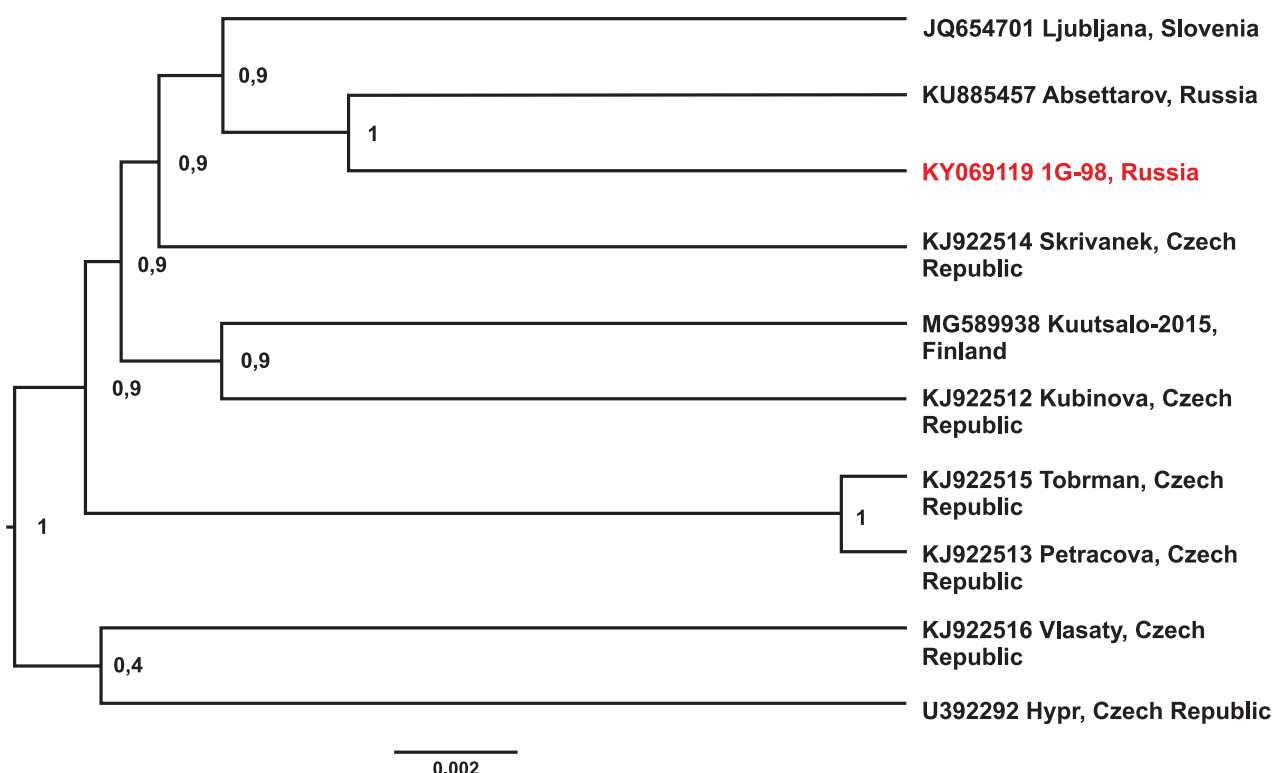


РИС. 1.

Дендрограмма ВКЭ-Евр, построенная на основании 10 последовательностей кодирующей части генома (10 245 п.н.) штаммов, выделенных от больных людей, с помощью метода байесовского анализа Монте-Карло с использованием цепей Маркова в пакете программ BEAST v. 1.10.4 (числа в узлах отражают апостериорную вероятность)

FIG. 1.

Dendrogram of TBEV-Eur constructed on the basis of 10 sequences of the genome coding part (10 245 bp.) of strains isolated from patients using Bayesian Markov chain Monte-Carlo analysis method in the BEAST v. 1.10.4 software package (the numbers at the nodes represent the posterior probability)

и *Hypr* из Чешской Республики, которые были изолированы в один и тот же год, был ниже (97,32 %). Достаточно высокий для ВКЭ-Евр уровень различий был зафиксирован и между штаммом *Kuutsalo-2015* и штаммом *Hypr* – 2,6 %. Уровень различий штамма *1G-98* с данными штаммами составил 2,39 и 2,71 % соответственно.

Интересно, что несмотря на то, что все штаммы из Чешской Республики были изолированы в течение одного сезона и в одном и том же регионе, на дендрограмме они вошли в состав разных клад. Эти штаммы были выделены в 1953 г. из крови пациентов, заболевших КЭ во время вспышки в Центральной Богемии (Чехословакия). У пациентов отмечалось тяжёлое клиническое течение заболевания. Считается, что это одни из старейших изолятов ВКЭ-Евр в Европе [15].

Штаммы *Tobrman* и *Petracova* на дендрограмме образовали единую кладу. Штамм *Kubinova* из Чешской Республики кластеризовался вместе со штаммом *Kuutsalo-2015*, выделенным в 2015 г. из мозжечка мужчины, погибшего от КЭ в Финляндии. Штамм *Ljubljana-1*, изолированный в 1992 г. из сыворотки крови больного КЭ человека из Словении, и штамм *Skrivanek* из Чешской Республики (1953 г.) на дендрограмме сформировали отдельные генетические линии. Штамм *Hypr*, как и другие штаммы из Чешской Республики, был изолирован в 1953 г. из крови заболевшего мальчика. Наиболее тесное генетическое родство к нему демонстрирует штамм *Vlasaty*.

Далее проводили сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-Евр, выделенных от больных людей в Европе и Восточной Сибири. В данный анализ дополнительно включили последовательности штаммов *214-67* и *172-68* из Восточной Сибири, которые были депонированы в GenBank в 2021 г., а также последовательность штамма *93/783*, который в 2019 г. был изолирован из сыворотки крови 56-летнего мужчины из Швеции с энцефалитической формой КЭ.

Анализ кодирующих частей геномов штаммов, изолированных от больных КЭ людей, в сравнении с прототипным штаммом ВКЭ-Евр *Neudorfl*, выявил наличие множества аминокислотных замен, которые распределены по всему полипротеину (табл. 1).

Каждый из рассмотренных нами штаммов имел от 23 (*Ljubljana-1*) до 40 (*Hypr*) аминокислотных замен относительно штамма *Neudorfl*. У штаммов ВКЭ-Евр из Восточной Сибири (*1G-98*, *214-67* и *172-68*) зафиксировано 35 таких замен.

Максимальное количество аминокислотных замен у всех без исключения штаммов выявлено в последовательности неструктурного белка NS5. Минимальное количество уникальных аминокислотных замен обнаружено в белках C, prM, NS2B и NS4A.

При сравнительном анализе геномов штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных КЭ людей из Иркутской области, со штаммами из Европы было выявлено множество аминокислотных замен, которые

ТАБЛИЦА 1

КОЛИЧЕСТВО АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН
В ПОЛИПРОТЕИНАХ ШТАММОВ ВКЭ-ЕВР,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ КЭ ЛЮДЕЙ,
В СРАВНЕНИИ СО ШТАММОМ *NEUDORFL*

TABLE 1

NUMBER OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS
IN THE POLYPROTEINS OF TBEV-EUR STRAINS ISOLATED
FROM PATIENTS WITH TBE,
IN COMPARISON WITH THE STRAIN *NEUDORFL*

Штамм	Белок										Всего
	C	prM	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	NS4b	NS5	
<i>Ljubljana-1</i>	0	0	3	1	4	2	3	0	5	6	23
<i>Kuutsalo2015</i>	0	0	1	3	4	2	2	0	3	9	24
<i>93/783</i>	0	0	3	1	4	2	3	1	4	7	25
<i>Skrivanek</i>	1	2	2	0	5	2	3	0	4	10	29
<i>Tobrman</i>	2	1	1	1	5	2	3	1	3	10	29
<i>Absettarov</i>	1	0	1	2	5	3	3	0	4	11	30
<i>Kubinova</i>	0	1	1	6	4	2	3	0	3	10	30
<i>Petracova</i>	2	2	2	2	5	2	3	1	2	10	31
<i>Vlasaty</i>	0	0	4	3	5	2	3	0	3	12	32
<i>214-67</i>	1	1	1	4	7	2	3	1	4	11	35
<i>172-68</i>	1	1	1	3	8	2	2	1	4	12	35
<i>1G-98</i>	1	1	2	3	8	2	2	1	4	11	35
<i>Hypr</i>	0	1	6	2	10	3	3	2	3	10	40

ТАБЛИЦА 2
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН
У ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ИЗОЛИРОВАННЫХ
ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ ИЗ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ
И ИЗ ВОСТОЧНОЙ И СЕВЕРНОЙ ЕВРОПЫ

TABLE 2
COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID
SUBSTITUTIONS IN EUROPEAN SUBTYPE TICK-BORNE
ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS
FROM EASTERN SIBERIA AND EASTERN AND NORTHERN
EUROPE

Штамм	Позиция в белке																					
	C	prM	E	NS1			NS2a					NS3		NS4a	NS4b			NS5				
	77	54	67	174	237	340	53	124	128	141	224	447	619	55	21	56	119	297	397	521	699	724
1G-98	R	M	G	K	M	H	M	E	L	M	A	I	G	A	R	V	F	E	K	Q	P	A
214-67	R	M	D	K	M	L	M	G	L	M	A	I	R	A	R	V	F	E	K	Q	P	A
172-68	R	M	D	K	M	H	M	G	L	M	A	I	G	A	R	V	F	K	K	Q	P	A
Absettarov	K	L	D	E	V	H	I	S	L	I	A	T	G	V	Q	I	L	E	K	K	A	T
Kubinova	K	L	D	E	V	H	I	S	F	I	S	T	G	V	Q	I	L	E	K	K	A	T
Petracova	K	L	D	E	V	H	M	S	F	I	S	T	G	A	R	I	L	E	K	K	A	T
Skrivanek	K	L	D	E	V	H	I	S	F	I	S	T	G	V	Q	I	L	E	K	K	A	T
Tobrmann	K	L	D	E	V	H	M	S	F	I	S	T	G	A	Q	I	L	E	K	K	A	T
Vlasaty	K	L	D	E	V	H	M	S	F	I	S	T	G	V	Q	I	L	E	K	K	A	S
Hypr	K	L	D	E	V	H	M	N	F	I	S	T	G	V	R	I	L	E	R	K	A	T
Ljubljana-1	K	L	D	E	V	H	I	S	F	I	S	T	G	V	Q	I	L	E	K	K	A	T
Kuutsalo2015	K	L	D	E	V	H	I	S	F	I	S	T	G	V	Q	I	L	E	R	K	A	T
93/783	K	L	D	E	V	H	I	S	F	I	S	T	G	A	Q	I	L	E	R	K	A	T

Примечание. Цветом выделены уникальные замены, серым – чаще всего встречающиеся аминокислотные остатки, белым цветом выделены замены, встречающиеся у нескольких штаммов.

встречаются во всех белках, за исключением белка NS2B (табл. 2). В последовательности штамма 1G-98 обнаружены две уникальные замены, одна из них – D67G – локализована в домене II белка E (рис. 2), а вторая – в белке NS2a.

У двух других штаммов из Иркутской области уникальные замены имеются в неструктурных белках (табл. 2). Штамм 172-68 имеет замену в белке NS5 (E297K), а у штамма 214-67 – по одной замене в белках NS1 (H340L) и NS3 (G619R). В позиции 124 белка NS2a у обоих штаммов вместо остатка серина, как у большинства исследованных штаммов, находится остаток глицина (S124G), а у штамма *Hypir* – аспарагина (S124N).

У всех трёх штаммов, изолированных от больных людей из Восточной Сибири, имеются идентичные замены в белках C (K77R), M (L54M) (рис. 3, а), NS1 (E174K, V237M) (рис. 3, б), NS2a (F128L, I141M, S224A), NS3 (T447I) (рис. 3, в), NS4a (V55A), NS4b (Q21R, I56V, L119F) и NS5 (K521Q, A699P, T724A) (рис. 3, г). Необходимо отметить, что большая часть вышеперечисленных аминокислотных замен была выявлена и у штаммов ВКЭ-Евр, выделенных из других источников (*I. persulcatus*, мелких млекопитающих) на территории Восточной Сибири в различные годы и, возможно, является маркером географической привязки штаммов к региону изоляции.

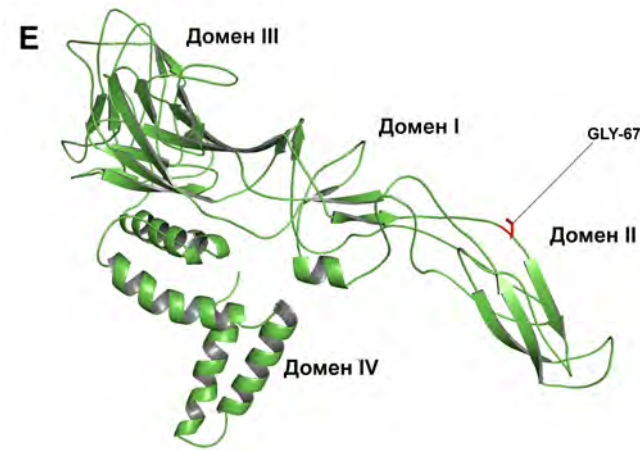


РИС. 2.
Расположение аминокислотных замен в белке E штамма 1G-98 ВКЭ-Евр

FIG. 2.
Amino acid substitutions location in E protein of TBEV-Eur strain 1G-98

В соответствии с аминокислотной позицией 53 белка NS2a среди штаммов ВКЭ-Евр, изолирован-

ных от больных КЭ людей, можно выделить две группы. У первой из них в этой позиции находится остаток изолейцина, как у штаммов западносибирской линии ВКЭ-Евр и ВКЭ-Сиб (табл. 2). В эту группу вошли штаммы из Европы *Ljubljana-1*, *Kubinova*, *Skrivanek*, *Kuutsalo-2015*, 93/783 и штамм из европейской части России *Absettarov*. У второй группы штаммов в аминокислотной позиции 53 белка NS2a находится остаток метионина. К этой группе относятся штаммы ВКЭ-Евр от больных из Восточной Сибири 1G-98, 214-67, 172-68, а также штаммы из Чешской Республики *Petracova*, *Tobrtman*, *Vlasaty* и *Hypr*.

Замены F128L и S224A в белке NS2a встречаются не только у штаммов от больных КЭ людей из Восточной Сибири, но и у штамма *Absettarov*. В позиции 55 белка NS4a замену V55A имеют все штаммы из Восточной Сибири, в том числе и изолированные от больных КЭ людей (табл. 2). Такие же замены выявлены у штаммов 93/783, *Petracova* и *Tobrtman* из Европы.

Считается, что сибирский и дальневосточный субтипы ВКЭ ассоциированы с более тяжёлым течением заболевания по сравнению с ВКЭ-Евр. Механизмы, по кото-

рым реализуется тяжесть заболевания КЭ в зависимости от субтипа вируса, остаются малоизученными.

Штаммы ВКЭ-Евр, ВКЭ-ДВ и ВКЭ-Сиб демонстрируют разную степень нейтроинвазивности и нейровирулентности при заражении лабораторных животных, что, возможно, является одним из объяснений в наблюдаемых различиях в клиническом течении КЭ. Однако важно отметить, что каждый субтип ВКЭ имеет в своём составе штаммы с низкой и высокой степенью патогенности. Так, например, штамм ВКЭ-Евр *Hypr* проявляет патогенность, аналогичную или даже более высокую, чем штамм ВКЭ-ДВ *Sofjin* [21].

Проведённое нами инфекционное титрование выявило, что штамм 1G-98 из Иркутской области проявляет высокую церебральную и периферическую активность. При заражении аутбредных лабораторных мышей массой 5–7 г 0,03 мл суспензии штамма 1G-98 в мозг инфекционный титр составил 8,72 IgLD₅₀/мл, при подкожном заражении – 6,35 IgLD₅₀/мл. Индекс инвазивности составил 2,37 IgLD₅₀/мл (< 3,0), что свидетельствует о способности данного штамма преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней.

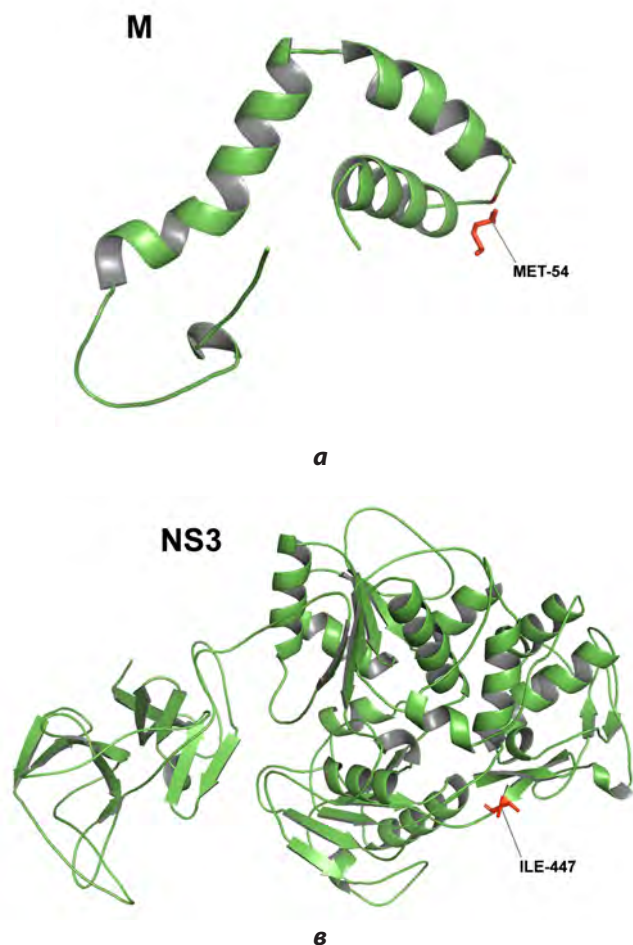


РИС. 3.
Расположение аминокислотных замен в белках М (а), NS1 (б), NS3 (б), NS5 (з) у штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных в Восточной Сибири

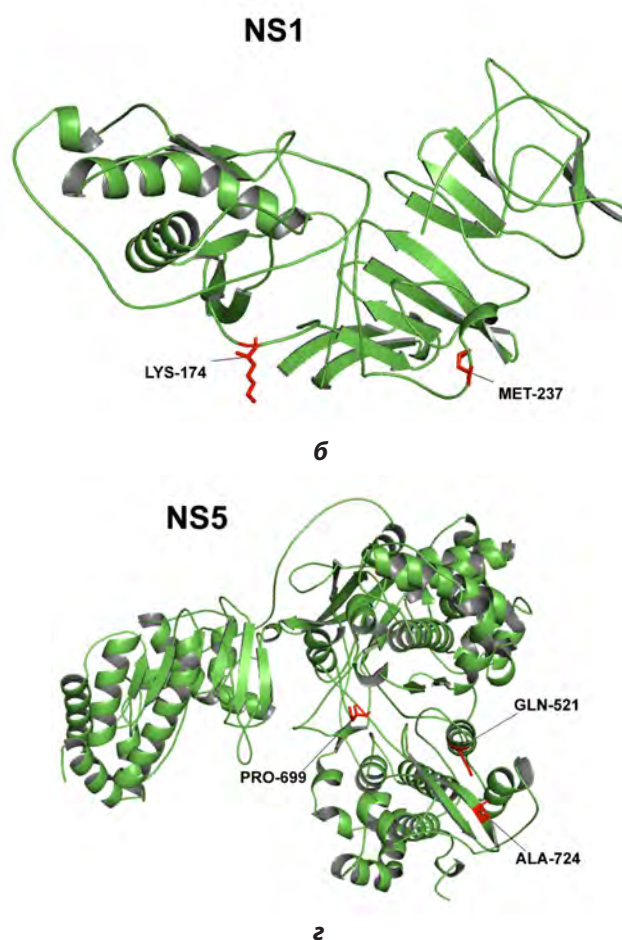


FIG. 3.
Amino acid substitutions location in M (a), NS1 (b), NS3 (b), NS5 (z) proteins of TBEV-Eur strains isolated from patients from Eastern Siberia

Штамм 1G-98 вызывал 100%-ю летальность у лабораторных мышей, средняя продолжительность жизни которых после интрацеребральной инокуляции вируса составила пять дней. Клиника КЭ, вызванного этим штаммом у человека в Иркутской области, характеризовалась умеренной лихорадкой, двухфазным течением, симптомами общей интоксикации, отсутствием менингеального синдрома и признаков остаточных явлений после перенесённой инфекции, что существенно не отличается от описания клинического течения КЭ, вызванного ВКЭ-Евр в Европе. Необходимо отметить, что такая клиническая картина заболевания наблюдалась у больного уже после осуществлённой серопротекции с помощью специфического донорского иммуноглобулина. К сожалению, мы не располагаем данными о клинической картине КЭ, которая отмечалась у больных, от которых были изолированы штаммы 214-67 и 172-68, а также об их патогенности для лабораторных животных.

Штамм *Absettarov* является высоковирулентным как при интрацеребральном, так и периферическом введении для лабораторных мышей BALB/c. По уровню вирулентности он сходен со штаммом *EK-328 ВКЭ-СиБ* (Балтийская линия) [22]. Штамм из Чешской Республики *Hypr* обладает более вирулентным фенотипом на мышинной модели, чем прототипный штамм ВКЭ-Евр *Neudoerfl*. Штамм 93/783 ВКЭ-Евр является высокопатогенным и нейровирулентным штаммом. При внутрибрюшинном и интрацеребральном заражении мышей линии C57BL/6 он оказался более вирулентным, чем штаммы ВКЭ-Евр (*Torö, HM467/09, Neudoerfl, Hypr, AS33*), а также штаммы ВКЭ-ДВ (*Sofjin*) и ВКЭ-СиБ (*Aina, M14/10*) [23].

Было установлено, что на нейропатогенез КЭ могут оказывать влияние мутации, происходящие не только в структурных, но и неструктурных белках вируса [21, 24].

Белок Е связан с основными биологическими характеристиками флавивирусов, включая адсорбцию вириона, рН-зависимую пенетрацию, гемагглютинацию, индукцию вируснейтрализующих и защитных антител, антителозависимое усиление вирулентности [21]. Белок Е опосредует тропизм и прикрепление ВКЭ к клетке хозяина и, следовательно, может быть решающим фактором, определяющим нейровирулентность и/или нейроинвазивность [21]. Было идентифицировано множество мутаций, которые ослабляют репродукцию флавивирусов через различные функциональные области белка Е [21, 24].

Наибольшее потенциальное влияние на нейропатогенез оказывает геномная изменчивость в домене III белка Е. Так, W.R. Jiang и соавт. на примере мутантов штамма вируса шотландского энцефалита (*Louping ill virus*) продемонстрировали важность аминокислотных замен в положениях с 308 по 311 белка Е для аттенуации вируса и его гемагглютинирующей активности [25]. Наиболее эффективной заменой в снижении нейровирулентности для лабораторных мышей было изменение остатка аспартата на аспарагин (D308N) в аминокислотном положении 308, которое представляет собой потенциальный сайт гликозилирования. Полученные результаты демонстрируют важность критических участков внутри гликопротеина оболочки как детерминант вирулентно-

сти вируса [25]. C.W. Mandl и соавт. с помощью направленного мутагенеза и использованием штамма *Neudoerfl* показали, что его вирулентность зависела от специфических остатков (E308, E310, E311 и E315) в белке Е, расположенных в области, которая считается потенциальной детерминантой связывания рецептора [21]. Наиболее значительная аттенуация ВКЭ для мышей была достигнута путём мутагенеза остатка треонина в позиции 310. Сочетание этой мутации с делеционными мутациями в 3'-некодирующей области генома привело к получению мутантов с высокой степенью аттенуации. Однако биологические эффекты мутации T310K могут быть в значительной степени обращены вспять мутацией в соседнем положении (K311E), которая возникла спонтанно во время заражения мышей [21]. Мутагенез других положений предоставил доказательства функциональной важности остатка 308 (Asp) и его зарядового взаимодействия с остатком 311 (Lys), тогда как остаток 309 мог быть изменён или даже удалён без каких-либо заметных последствий. Делеция остатка 309 сопровождалась спонтанной мутацией второго сайта (Phe на Tyr) в положении 332, которое в трёхмерной структуре белка Е пространственно близко к остатку 309. H. Holzmann и соавт. было показано, что аминокислотная замена G368R в штамме *Neudoerfl* связана с потерей нейроинвазивности, а аминокислотные замены Y384H и G386R могут приводить к локальным изменениям заряда, поскольку фланкирующие аминокислоты могут играть важную роль в образовании дисульфидной связи [21]. G. Wallner и соавт. сравнили геномные последовательности двух штаммов ВКЭ-Евр: *Hypr* (штамм с длительной пассажной историей, выделен от человека) и 263 (штамм изолирован непосредственно от клещей). В отличие от штамма 263, штамм *Hypr* показал значительно более высокую нейроинвазивность для мышей, чем штамм-прототип. Авторы идентифицировали небольшое количество специфических аминокислот, особенно в положении 390, которые могут влиять на нейропатогенез [21].

У проанализированных нами аминокислотных последовательностей штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных людей, мутация в домене III белка Е наблюдалась только у штамма *Hypr* (H390Y) (табл. 3).

Мутация D67G, выявленная нами в домене DII белка Е у штамма 1G-98, ранее была описана Л.И. Козловской и соавт. на примере клона 18А штамма ВКЭ-Евр *Absettarov*, полученного путём клонирования вируса после четырёх пассажей в культуре клеток СПЭВ [22]. Было установлено, что так же как и родительский штамм, клон 18А сохранял высокую вирулентность для мышей, гемагглютинирующую активность в отношении эритроцитов гуся и способность к формированию крупных бляшек в культуре клеток [22].

Мутация D67G, E122G и D277A (домен DII), введённые в штаммы сибирского субтипа, индуцировали повышенную гидрофобность и положительный заряд на поверхности вириона. Интересно, что все три сконструированных вирусных мутанта продемонстрировали меньшую нейроинвазивность для лабораторных мышей, чем вирус дикого типа. D67G-мутации в белке Е наблюдалась

ТАБЛИЦА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ИЗВЕСТНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ
ВИРУЛЕНТНОСТИ У ШТАММОВ ВКЭ-ЕВР,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 3

IDENTIFICATION RESULTS OF KNOWN VIRULENCE
DETERMINANTS IN TBEV-EUR STRAINS ISOLATED
FROM PATIENTS

Штамм	Позиция в последовательности белка, а. о.								
	E				NS4b		NS5		
	67	83	390	463	95	213	634	692	724
1G-98	G	A	H	A	M	A	A	I	A
214-67	D	A	H	A	M	A	A	I	A
172-68	D	A	H	A	M	A	A	I	A
<i>Absettarov</i>	D	A	H	A	M	A	A	I	T
<i>Kubinova</i>	D	A	H	A	M	A	A	I	T
<i>Petracova</i>	D	A	H	A	M	A	A	T	T
<i>Skrivanek</i>	D	A	H	A	M	A	T	I	T
<i>Tobrmann</i>	D	A	H	A	M	A	A	T	T
<i>Vlasaty</i>	D	A	H	A	M	A	A	S	S
<i>Hypr</i>	D	A	Y	A	M	A	A	I	T
<i>Ljubljana-1</i>	D	A	H	A	V	A	A	T	T
<i>Kuutsalo2015</i>	D	A	H	A	M	A	A	I	T
<i>93/783</i>	D	T	H	S	M	V	A	I	T

Примечание. Цветом выделена уникальная мутация (красным – для штаммов с Восточной Сибири, серым – для штаммов из Европы), белым – чаще всего встречающиеся замены в аминокислотной последовательности.

у семи штаммов ВКЭ-ДВ (шесть выделены от больных КЭ людей, один штамм – от мелкого млекопитающего) и одного штамма ВКЭ-Сиб – *Yar46-2* (EU444079), изолированного от человека, умершего от КЭ в 2001 г. [26]. Штаммы ВКЭ-ДВ с такой мутацией были также выделены в 1943 г. в северо-западном регионе России (*Volkhov-Knromov* (FJ214114)), в 1942 и 1943 гг. на Урале (*T-blood* (AF091019), *Ural-Nina* (FJ214119), *Ural-Ponomarev* (FJ214118), *Ural-Belyaeva* (FJ214117) и *Ural-Antipov* (FJ214115)), а также в 1998 г. от *Apodemus agrarius* (*Est2546* (DQ393779)) в Эстонии [26]. Мутация D67G, выявленная в случае летального исхода КЭ в Монголии, по-видимому, увеличивает способность ВКЭ преодолевать гематоэнцефалический барьер, что, вероятно, объясняет фатальный исход энцефалита у пациента [27]. Н. Holzmann и соавт. показали, что мутант по домену DI Y181D и мутант по домену DII A123K белка Е штамма ВКЭ-Евр *Neudoerfl* демонстрируют значительно сниженную нейроинвазивность после подкожной инокуляции мышам-альбиносам GP Swiss [21]. Мутация N154L, введенная путём сайт-направленного мутагенеза в сайт гликозилирования белка Е в домене DI, значительно снижала нейровирулентность химер TBEV-DEN-4 у мышей и ограничивала репликацию вируса в клеточной культуре [21]. Специфическая замена V463A расположена в трансмембранном домене белка Е и различается у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с субклиническими и тяжёлыми и форма-

ми КЭ [28]. В позиции 463 белка Е у штаммов ВКЭ-ДВ, выделенных от людей с лёгкими формами инфекции, находится остаток аланина, а у штаммов, изолированных от людей с тяжёлыми формами КЭ, находится остаток валина. При этом у штамма ВКЭ-Евр 93/783 в этой позиции находится остаток серина. Данный штамм прошёл минимальное количество пассажей и обладает более высокой вирулентностью по сравнению с другими штаммами европейского, сибирского и дальневосточного субтипов [23]. R. Lindqvist и соавт. было показано, что штамм 93/783 имеет две аминокислотные замены в белке Е – A83T и A463S, которые при введении их в геном непатогенного штамма *Toro* усиливают инфицирование нейронов, а также репликацию вируса *in vivo* [23].

В штамме *Oshima 5-10* (ВКЭ-ДВ) аминокислотная замена S40R/P в положении 40 в домене DI белка Е приводит к уменьшению размеров бляшек, к выходу инфекционного вируса в культуре клеток и к снижению нейровирулентности для мышей [21]. А. Goto и соавт. наблюдали потерю нейроинвазивности мутанта A483G по сравнению с родительским штаммом *Oshima 5-10* (ВКЭ-ДВ) у мышей. Эта замена расположена в якорном домене белка Е [21].

Аминокислотные замены в белке NS5 могут оказывать влияние на нейровирулентность штаммов ВКЭ не только за счёт изменения эффективности репликации вирусной РНК или ингибирования продукции ин-

терферона, но и за счёт взаимодействия с некоторыми клеточными белками, что может приводить к изменению патогенных свойств вируса. Г.Н. Леонова и соавт. показали важность некоторых ключевых замен (S634T, R677K, I692V и A724S) в РНК-зависимом домене РНК-полимеразы (RdRp) белка NS5, которые могут влиять на патогенность штаммов ВКЭ-ДВ [28, 29]. Замена A724S локализована в мотиве Е РНК-зависимой полимеразы, рядом с важным функциональным доменом, ответственным за связывание ионов цинка (Zn^{2+}), тогда как остальные три замены – S634T, R677K и I692V – консервативны [28, 29]. У всех штаммов ВКЭ-Евр, взятых нами в анализ, в позиции 634 белка NS5 находится остаток аланина, за исключением штамма *Skrivanek* из Чешской Республики, у которого в этой позиции он заменён на остаток треонина, как и у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с субклиническим течением заболевания. В позиции 692 белка NS5 у 10 из 14 исследованных штаммов ВКЭ-Евр находится остаток изолейцина, как и у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с тяжёлым течением заболевания, а у штаммов *Ljubljana-1*, *Petracova* и *Tobrman* остаток изолейцина заменён на остаток треонина, в то время как у штамма *Vlasaty* он заменён на остаток серина. Эти замены локализованы в области hmd белка NS5, формирующей матричный входной канал полимеразы ВКЭ. Р. Фофанова и соавт. предположили, что эти замены могут быть ответственны за лучшее взаимодействие с транзакционными факторами репликации хозяина [15]. В позиции 724 белка NS5 у штаммов ВКЭ-Евр из Восточной Сибири (1G-98, 172-63, 214-67) находится остаток аланина, как у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с тяжёлым течением заболевания, а у штамма *Vlasaty* – остаток серина, как у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с субклиническим течением заболевания. У всех остальных штаммов ВКЭ-Евр от больных людей в этом положении находится остаток треонина.

Используя клоны штамма *Oshima* (ВКЭ-ДВ), D. Hayasaka и соавт. показали, что изменения аминокислотных остатков в позициях 378 (V378R/A) и 674 (R674K) влияют на нейровирулентность и нейроинвазивность вируса при заражении лабораторных мышей BALB/c [21]. A.R. Engel и соавт. оценили кандидатную вакцину на основе химерного аттенуированного вируса, содержащую гены структурных белков ВКЭ (штамм *Sofjin*, ВКЭ-ДВ), на примере химеры ВКЭ-вируса денге (ВКЭ/DEN4). Эта молекулярная конструкция показала высокий уровень нейровирулентности как для мышей, так и для обезьян. Введение, с одной стороны, мутации в белке Е (315) или мутаций в белке NS5 (654, 655), а с другой стороны, обеих мутаций в белках Е (315) и NS5 (654, 655), приводило к ступенчатому ослаблению вируса как *in vitro*, так и *in vivo* с низким, умеренным и высоким уровнем аттенуации соответственно [21].

За исключением белков Е и NS5, роль структурных и неструктурных белков во взаимодействиях «вирус – хозяин» мало изучена, и доступно лишь малое количество данных, в основном полученных на штаммах ВКЭ-ДВ. Г.Н. Леонова и соавт. выявили связь делеции аминокислотного остатка в позиции 111 капсидного белка С

с тремя ключевыми аминокислотными заменами, потенциально влияющими на патогенез у некоторых штаммов ВКЭ-ДВ [29]. При введении определённых делеций и аминокислотных замен в белок С может нарушаться сборка инфекционных частиц [21]. Некоторые точечные мутации, расположенные в положениях 45 и 46 протеазы NS3, могут оказывать влияние на процесс отпочкования вирусных частиц и приводить к снижению нейроинвазивности вируса для лабораторных мышей [28, 29]. Более того, мутации, картированные в непосредственной близости от активного сайта сериновой протеазы NS2B-NS3, могут определять нейротропность ВКЭ [21]. Мутации в белке NS1 связаны с хроническим прогрессированием заболевания в случаях инфекции, вызванной ВКЭ-Сиб [21].

Неструктурный белок NS4B является крупнейшим из небольших гидрофобных белков вируса и содержит 252 аминокислоты и 5 гидрофобных областей с четырьмя трансмембранными доменами. Он взаимодействует с хеликазным доменом NS3 и может служить антагонистом интерферона [21]. С.И. Беликовым и соавт. показано, что штаммы ВКЭ-ДВ, изолированные от людей с тяжёлыми формами КЭ, имеют три ключевые замены в белке NS4B, две из которых, M95V и V179A, расположены в трансмембранных доменах 2 и 3, а замена A213V локализована в гидрофильной области, между трансмембранными доменами 3 и 4 [28]. У штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных людей, в позиции 95 находится остаток метионина, как у штаммов ВКЭ-ДВ, выделенных от людей с тяжёлыми формами КЭ. Исключением из этого правила является штамм *Ljubljana-1*, у которого в этой позиции находится остаток валина, как у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с субклиническими формами КЭ. Ключевая замена A213V была выявлена только у высокопатогенного штамма 93/783 ВКЭ-Евр, в то время как у всех остальных штаммов ВКЭ-Евр от больных людей в этой позиции находился остаток аланина, как у штаммов ВКЭ-ДВ, изолированных от людей с тяжёлыми формами КЭ.

Геномные детерминанты, потенциально ассоциированные с энцефалитическими и геморрагическими проявлениями заболевания и выявленные у некоторых патогенных для человека клещевых флавивирусов, которые были описаны в работе А.Н. Бондарюка и соавт., у штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных КЭ людей, нами не обнаружены [30].

3'-нетранслируемая область генома (3'-UTR) ВКЭ содержит несколько консервативных структурных ствольных петель, которые важны для процессов репликации, инициации трансляции и упаковки вируса [21]. В 3'-UTR ВКЭ выделяют 5'-концевую вариабельную область, гетерогенную как по длине, так и по последовательности, необходимую для репликации генома вируса и 3'-высококонсервативный коровый элемент [21]. Вариабельная область 3'-UTR считается важной для естественного цикла передачи ВКЭ, но, по-видимому, не участвует в репликации вируса и не влияет на вирулентность [21]. Последовательность и длина вариабельной области у разных штаммов ВКЭ различаются, при этом некоторые штаммы содержат в этой области поли(А)-тракт. Делеции в последовательности ва-

риабельной области генома были выявлены у штаммов ВКЭ трёх основных субтипов. Эти штаммы были либо выделены от позвоночных животных и клещей и пассированы в культуре клеток млекопитающих, либо выделены из клинических образцов [15, 28, 29]. Однако положение и размер этих делеций не консервативны и варьируются в зависимости от штамма. С.И. Беликов с соавт. описали варианты ВКЭ-ДВ с обширными делециями, охватывающими почти всю 3'-UTR, выделенными от пациентов, которые вызывали либо субклиническую инфекцию, либо тяжёлое течение заболевания [28]. Самая длинная делеция в 3'-UTR была обнаружена у штаммов, принадлежащих к кластеру штаммов ВКЭ-ДВ, вызывающих субклиническую форму заболевания. Эта закономерность предполагает, что обширная делеция может значительно снизить патогенность вируса. Исходя из этого, авторы предположили, что расширенная делеция, если она не затрагивает консервативную концевую часть 3'-UTR (325 нуклеотидов), оказывает умеренное влияние на патогенность [28]. Однако в отношении делеций в 3'-UTR для ВКЭ-Евр наблюдались противоречивые результаты. Некоторые делеции, введённые в 3'-UTR штамма *Neudoerfl*, вызывали сильное ослабление вирулентности на мышинной модели [21], в то время как присутствие протяжённой делеции в 3'-UTR у штамма *Huyp* было ассоциировано с высокой вирулентностью [21]. Механизм возникновения делеций, а также их значение в эволюции вирусной популяции пока остаются неясными и требуют дополнительных исследований. Кроме того, некоторые штаммы ВКЭ-Евр содержат поли(А)-тракт, расположенный в вариабельной области 3'-UTR, который, по-видимому, влияет на вирулентность штаммов для лабораторных мышей [21]. Более поздние исследования также показали, что как длина вариабельной области, так и наличие поли(А)-тракта могут модулировать вирулентность штаммов ВКЭ-ДВ [21]. N. Ashgar с соавт. показали, что штаммы с длинным поли(А)-трактом были ослаблены в культуре клеток, но более вирулентны при инокуляции лабораторным мышам [21].

В ходе нашего исследования установлено, что у штамма 1G-98 имеется протяжённая делеция в вариабельной части 3'-некодирующей области генома, длина которой сопоставима с таковой у штамма *Huyp* (235 нуклеотидов). Оба штамма являются высоковирулентными для лабораторных мышей. Более протяжённые делеции выявлены у штаммов *Kubinova* (351) и *Vlasaty* (318) из Чехословакии. У штамма *Kubinova* также имеются небольшие делеции в консервативной части 3'-некодирующей области генома. Поли(А)-тракт в 3'-UTR у штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных КЭ людей, не обнаружен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы получена полногеномная характеристика штаммов ВКЭ-Евр, изолированных от больных людей на территории Иркутской области. Впервые проведён сравнительный анализ штаммов ВКЭ-Евр, выделенных от пациентов с КЭ из Восточной Сибири и из Вос-

точной и Северной Европы. Показано, что по кодирующей области генома уровень сходства штаммов ВКЭ-Евр из Восточной Сибири не превышает установленный ранее максимальный для данного субтипа уровень различий в 3,1 %. Установлено, что штамм 1G-98, выделенный из крови больного КЭ из Иркутской области, является высоковирулентным. При заражении лабораторных мышей он характеризуется высокими показателями церебральной и периферической активности. Поиск детерминант вирулентности выявил у штамма 1G-98 мутацию D67G в домене DII белка E, которая может быть потенциально ассоциирована с вирулентностью, а также штамм имеет протяжённую делецию в вариабельной части 3'-некодирующей области генома, сопоставимую по длине с высоковирулентным штаммом *Huyp* из Европы.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках гос. задания № 1021060107125-0 и Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Current ICTV Taxonomy Release*. URL: <https://ictv.global/taxonomy> [date of access: 01.07.2024]
2. Савинова Ю.С. Европейский субтип вируса клещевого энцефалита. Обзор литературы. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(4): 100-113. [Savinova YuS. European subtype of tick-borne encephalitis virus. Literature review. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(4): 100-113. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2021-6.4.9
3. Fares W, Dachraoui K, Cherni S, Barhoumi W, Slimane TB, Younsi H, et al. Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks, Tunisia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2021; 12(1): 101606. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101606
4. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В., Верхозина М.М., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(4): 13-18. [Demina TV, Dzhioev YP, Kozlova IV, Verkhosina MM, Tkachev SE, Doroshchenko EK, et al. Genotypes 4 and 5 of the tick-borne encephalitis virus: Features of the genome structure and possible scenario for its formation. *Problems of Virology*. 2012; 57(4): 13-18. (In Russ.)].
5. Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Верхозина М.М., и др. Характеристика байкальского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на территории Восточной Сибири. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 53-60. [Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, Doroshchenko EK, Lisak OV, Verkhosina MM, et al. Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 53-60. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2018-3.4.9
6. Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau,

China. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6

7. Верхозина М.М., Козлова И.В., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., и др. Распространение генотипов вируса клещевого энцефалита в различных типах ландшафтов Сибири. *Acta biomedica scientifica.* 2017; 2(5(1)): 69-75. [Verkhovina MM, Kozlova IV, Doroshchenko EK, Lisak OV, Demina TV, et al. Distribution of tick-borne encephalitis virus genotypes in various types of landscapes of Siberia. *Acta biomedica scientifica.* 2017; 2(5(1)): 69-75. (In Russ.)]. doi: 10.12737/article_59e8bd10164039.21079786

8. Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* 2019; 164: 23-51. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014

9. Borde JP, Zajkowska J. Chapter 5: Tick-borne encephalitis in adults. In: *TBE in adults*. Ed by G Dobler, HJ Schmitt, W Erber. Global Health Press Pte Limited, 2018: 70-84.

10. Аитов К.А., Бурданова Т.М., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиев Ю.П., Козлова И.В., и др. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири: этиология, молекулярная эпидемиология, особенности клинического течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018; 7(3): 31-40. [Aitov KA, Burdanova TM, Verkhovina MM, Demina TV, Dzhiyev YuP, Kozlova IV, et al. Tick-borne encephalitis in Eastern Siberia: Etiology, molecular epidemiology, and peculiarities of the clinical course. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training.* 2018; 7(3): 31-40. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2305-3496-2018-13005

11. Demina TV, Tkachev SE, Kozlova IV, Doroshchenko EK, Lisak OV, Suntsova OV, et al. Comparative analysis of complete genome sequences of European subtype tick-borne encephalitis virus strains isolated from *Ixode persulcatus* ticks, long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*), and human blood in the Asian part of Russia. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2017; 8(4): 547-553. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.03.002

12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

13. Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics.* 2002; 161(3): 1307-1320. doi: 10.1093/genetics/161.3.1307

14. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 214-221. doi: 10.1186/1471-2148-7-214

15. Formanová P, Černý J, Bolfiková BČ, Valdés JJ, Kozlova I, Dzhiyev Y, et al. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(1): 38-46. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.09.002

16. RCSB Protein Data Bank. URL: <https://www.rcsb.org/> [date of access: 01.07.2024]

17. Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server. *Nat Protoc.* 2009; 4(3): 363-371. doi: 10.1038/nprot.2009.2

18. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science.* 2014; 343(6173): 881-885. doi: 10.1126/science.1247749

19. Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol.* 2008; 82(1): 173-183. doi: 10.1128/JVI.01788-07

20. Lu G, Gong P. Crystal structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathog.* 2013; 9(8): e1003549. doi: 10.1371/journal.ppat.1003549

21. Velay A, Paz M, Cesbron M, Gantner P, Solis M, Soulier E, et al. Tick-borne encephalitis virus: Molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol.* 2019; 45(4): 472-493. doi: 10.1080/1040841X.2019.1629872

22. Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Shevtsova AS, Romanova LI, Rogova YV, Dzhivanian TI, et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology.* 2010; 398(2): 262-272. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.012

23. Lindquist R, Rosendal E, Weber E, Asghar N, Schreier S, Lenman A, et al. The envelope protein of tick-borne encephalitis virus influences neuron entry, pathogenicity, and vaccine protection. *J Neuroinflammation.* 2020; 17(1): 284. doi: 10.1186/s12974-020-01943-w

24. Kellman EM, Offerdahl DK, Melik W, Bloom ME. Viral determinants of virulence in tick-borne flaviviruses. *Viruses.* 2018; 10(6): 329. doi: 10.3390/v10060329

25. Jiang WR, Lowe A, Higgs S, Reid H, Gould EA. Single amino acid codon changes detected in Louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *J Gen Virol.* 1993; 74(5): 931-935. doi: 10.1099/0022-1317-74-5-931

26. Демина Т.В., Козлова И.В., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Савинова Е.С., и др. Определение и сравнительный анализ геномной структуры сибирских штаммов вируса клещевого энцефалита Европейского субтипа. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(1): 29-36. [Demina TV, Kozlova IV, Tkachev SE, Doroshchenko EK, Lisak OV, Savinova ES, et al. Determination and comparative analysis of the genomic structure of Siberian strains of tick-borne encephalitis virus of the European subtype. *Problems of Virology.* 2018; 63(1): 29-36. (In Russ.)]. doi: 10.18821/0507-4088-2018-63-1-29-36

27. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Кулакова Н.В., Tungalag K., Арбатская Е.В., Миронова Л.В., и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55(3): 27-32. [Khasnatinov MA, Danchinova GA, Kulakova NV, Tungalag K, Arbatskaya EV, Mironova LV, et al. Genetic characteristics of the causative agent of tick-borne encephalitis in Mongolia. *Problems of Virology.* 2010; 55(3): 27-32. (In Russ.)].

28. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, Leonova GN. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94946. doi: 10.1371/journal.pone.0094946

29. Leonova GN, Belikov SI, Kondratov IG, Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology.* 2013; 443(1): 89-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.029

30. Bondaryuk AN, Kulakova NV, Potapova UV, Belykh OI, Yudincheva AV, Bukin YS. Genomic determinants potentially associated with clinical manifestations of human-pathogenic tick-borne flaviviruses. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(21): 13404. doi: 10.3390/ijms232113404

Сведения об авторах

Козлова Ирина Валерьевна – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: diwerhoz@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6324-8746>

Сунцова Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: olga_syntsova@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4057-2890>

Ткачев Сергей Евгеньевич – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная вирусология», Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», e-mail: sergey.e.tkachev@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7767-380X>

Парамонов Алексей Игоревич – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: Paramonov_a.i@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7156-4036>

Дорошенко Елена Константиновна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8209-616X>

Лисак Оксана Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: lisak.liza@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3909-7551>

Охотина Юлия Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: vippersona2389@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8183-1233>

Information about the authors

Irina V. Kozlova – Dr. Sc. (Med.), Head at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: diwerhoz@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6324-8746>

Olga V. Suntsova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: olga_syntsova@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4057-2890>

Sergey E. Tkachev – Senior Research Officer, Head of Research Laboratory “Molecular Virology”, Associate Professor of the Department of Genetics, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, e-mail: sergey.e.tkachev@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7767-380X>

Aleksei I. Paramonov – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: paramonov_a.i@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7156-4036>

Elena K. Doroshchenko – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8209-616X>

Oksana V. Lisak – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: lisak.liza@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3909-7551>

Julia S. Okhotina – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: vippersona2389@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8183-1233>