

Исследование генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в эндемичных регионах Российской Федерации и странах ближнего зарубежья

Шигапова Л.Х. (Казанский федеральный университет), shi-leyla@yandex.ru

Шайхутдинов Н.М. (Казанский федеральный университет),

Шагимарданова Е.И. (Казанский федеральный университет),

Козлова И.В. (Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск),

Чичерина Г.С. (Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск),

Якименко В.В. (Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций, г. Омск),

Лисак О.В. (Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск),

Дорощенко Е.К. (Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск),

Ткачев С.Е. (Казанский федеральный университет), sergey.e.tkachev@mail.ru

Проблема заражения клещевым энцефалитом остается актуальной, особенно в весенне-летний период, в сезонную активность иксодовых клещей. Возбудителем инфекции является вирус клещевого энцефалита (далее ВКЭ), относящийся к группе вирусов семейства *Flaviviridae*.

Клещевой энцефалит — тяжелое инфекционное заболевание, часто приводящее к летальному исходу. Его вызывает одноименный вирус, геном которого состоит из одноцепочечной РНК. На основании последовательностей геномов вирус делится на большие группы (субтипы): европейский, сибирский (ВКЭ-Сиб) и дальневосточный (1), а также предполагаемые субтипы байкальский (2) и гималайский (3). Эти группы произошли от общего предка несколько сотен или тысяч лет назад, и предполагается, что с тех пор они развивались независимо (4). Появление новых генетических вариантов вируса возможно как под действием таких факторов, как смена хозяйских видов-природных резервуаров и клещей-переносчиков, так и, возможно, вследствие рекомбинации геномов (5), хотя в случае ВКЭ данный вопрос по-прежнему является дискуссионным. Субтип ВКЭ-Сиб содержит по крайней мере пять различных генетических линий: Заусаев, Васильченко, Боснийская, Балтийская, Обская (1), и каждая линия имеет определенные закономерности географического распространения.

Основной проблемой в изучении генетической изменчивости и понимания эволюционного пути ВКЭ является недостаточное количество полногеномных последовательностей вируса, представленных в базах данных. Исследования генетического разнообразия возбудителей позволит усовершенствовать существующие и разрабатывать новые системы диагностики, позволяющие выявлять широкий спектр генетических модификаций вируса.

В настоящее время в базе данных GenBank содержится около 250 полногеномных последовательностей ВКЭ, причем сибирский субтип является наименее представленным среди них, и задача увеличения выборки полногеномных последовательностей вируса является актуальной. Поэтому, целью данного исследования является изучение генетического разнообразия ВКЭ в эндемичных регионах Российской Федерации, а также странах ближнего зарубежья на уровне полных геномов с использованием методов массового геномного секвенирования.

Для полногеномного секвенирования были отобраны 300 штаммов из различных эндемичных регионов (Табл.1). РНК вируса выделили из мозговых суспензий зараженных ВКЭ лабораторных мышей с помощью коммерческого набора QIAamp Viral RNA Kit. Пробоподготовка РНК-библиотек осуществлялась с помощью набора KAPA RNA HyperPrep Kit (Roche, Швейцария), таргетное обогащение полученных библиотек осуществляли с использованием технологии SeqCap EZ (Roche, Швейцария). Секвенирование готовой библиотеки производили с помощью высокопроизводительного секвенатора MiSeq (Illumina). Использовали вариант секвенирования парных концевых фрагментов (2x150), общее количество циклов составило 300.

Таблица 1. Сведения о штаммах ВКЭ, изолированных на территории Российской Федерации и странах ближнего зарубежья

Территория изоляции штаммов	Количество выявленных штаммов
Новосибирская область	104
Республика Бурятия	60
Омская область	35
Иркутская область	29
Урал	21
Алтай	10
Киргизия	7
Приморский край	6
Крым	6
Республика Удмуртия	5
Амурская область	3
Калининградская, Калужская, Ленинградская области	3
Сахалин	2
Хабаровский край	2
Казахстан	2
Босния	2
Забайкальский Край	1
Красноярский Край	1
Белоруссия	1

Для полученных 300 последовательностей кодирующей части генома ВКЭ и референсных последовательностей ВКЭ различных субтипов и генетических линий из базы данных GenBank была построена дендрограмма (Рис.1) с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в графическом интерфейсе программы MegaX и проведен анализ генетического разнообразия.

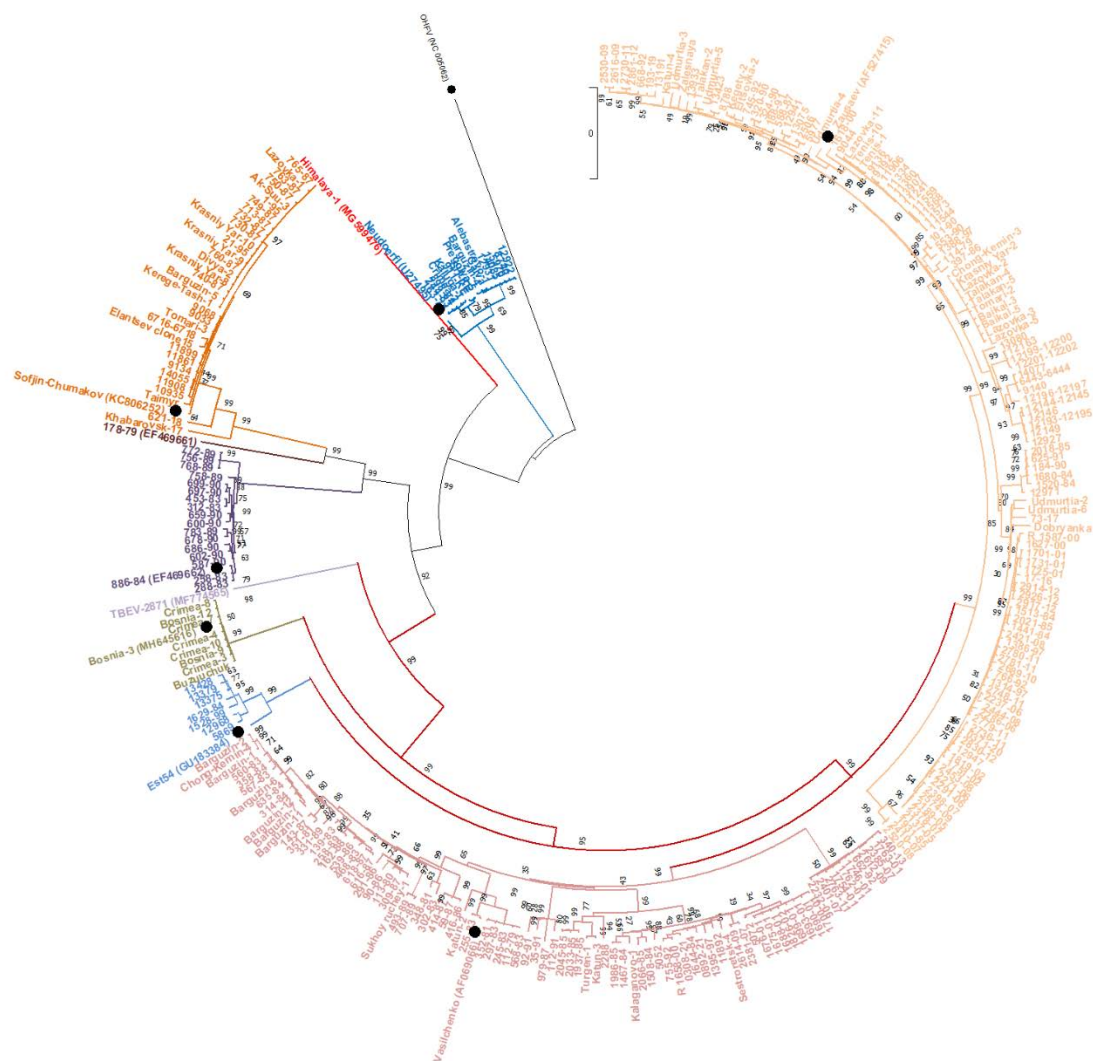


Рисунок 1. Дендрограмма штаммов ВКЭ на основе последовательностей фрагмента кодирующей области генома. Большая часть штаммов относится к Сибирскому субтипу, которая включает в себя генетические линии: Заусаев (желтый), Васильченко (розовый), Балтийская (голубой), Боснийская (зеленый), Обская (сиреневый); Байкальский субтип (фиолетовый), Дальневосточный субтип (оранжевый), Европейский субтип (синий), а также единичные штаммы Гималайского субтипа и субтипа 178-79. Вирус омской геморрагической лихорадки (черный) использовали в качестве внешней группы.

Результаты нашего исследования показали, что некоторые генетические варианты ВКЭ, описанные в данной работе, обнаружены и на территориях, не свойственных распространению данных вариантов. Анализ полногеномных последовательностей, полученных в настоящей работе, показал, что штаммы Балтийской линии сибирского субтипа были обнаружены и охарактеризованы в Новосибирской и Омской областях, а также впервые в Казахстане. На этих территориях не обнаружены представители ранее описанной Обской линии, которая оказалась наиболее генетически отличной от других генетических линий ВКЭ-Сиб. На территории полуострова Крым, в Боснии и Кыргызстане выявляются штаммы ВКЭ Сибирского субтипа Боснийской генетической линии. Помимо Боснийской линии, в Кыргызстане была обнаружена линия Васильченко ВКЭ-Сиб, что является первым случаем ее обнаружения в этом регионе. Помимо этих линий, в Кыргызстане была выявлена линия Заусаев ВКЭ-Сиб, наиболее распространенная на всем ареале встречаемости ВКЭ в Евразии, а также дальневосточный субтип ВКЭ, не описанный здесь ранее. Все это свидетельствует о возможной существенной территориальной миграции вирусов, и благодаря таким работам мы можем проследить циркуляцию штаммов вне своего основного ареала.

С учетом того, что в настоящее время в базе данных GenBank представлено около 250 полногеномных последовательностей ВКЭ, полученные нами данные позволяют существенно увеличить количество данных о генетическом разнообразии ВКЭ, и использовать их для разработки высокоспецифичных тест-систем, учитывающих все разнообразие вируса.

1. Tkachev et al. (2020), Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus, *Ticks and Tick-borne Diseases* 11
2. Kozlova et al., (2018) Characteristics of the baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in eastern siberia. *Acta Biomed Sci.* 3(4)
3. Dai et al. (2018), A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* 7 (1), 74
4. Heinze et al. (2012), Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses using phylogenetic and biogeographic analyses, *J. Virol.* 86 (16)
5. Sukhorukov et al. (2023), The Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus is evident of recombination between Siberian and Far-Eastern subtypes, *PLoS Negl Trop Dis* 17(3)