УДК 576.856.25

**Н.В. Кулакова, С.И. Беликов, Г.Н. Леонова**

# РАЗРАБОТКА СПОСОБА ЭКСПРЕСС-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток

Показана возможность использования анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для генотипирования штаммов вируса клещевого энцефалита. С помощью рестриктазы BstDEI подтверждена принадлежность 10 из 11 проанализированных штаммов к дальневосточному субтипу. Нетипируемый этим методом штамм Р-85 дополнительно исследован с использованием эндонуклеазы TspRI. Показана его принадлежность также к дальневосточному субтипу вируса клещевого энцефалита.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генотипирование

Типирование вирусов с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализа) широко используется в мировой практике как для проведения эпидемиологических, так и клинических исследований [1, 2]. Несмотря на то, что определение субтипа вируса клещевого энцефалита (КЭ) обычно проводят с помощью анализа молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот или определения нуклеотидной последовательности участков генома, оба способа генотипирования являются достаточно трудоемкими [3, 4, 5, 6]. Усовершенствованные методы типирования флавивирусов основаны на различных модификациях анализа амплифицированных фрагментов генома (ПДРФ, SSCP, CFLP, RSS-PCR), которые позволяют быстро проводить скрининг большого количества штаммов [7, 8, 9]. Типирование штаммов, основанное на ПДРФ-анализе, ранее не применялось для представителей группы вирусов, переносимых клещами.

**Целью настоящей работы** явилась оценка возможности использования ПДРФ-анализа для генотипирования штаммов вируса клещевого энцефалита.

**Материал и методы исследования**

В работе использованы дальневосточные штаммы Р-91, Р-85, Р-92, Р-336, Р-73, Р-82, Р-212, Р-332, Р-315, Р-253, Р-94 вируса КЭ. Исследуемые штаммы вызвали различное клиническое течение КЭ от бессимптомной инаппарантной формы до манифестных форм с различными клиническими проявлениями, среди которых были представлены стертая, лихорадочная и очаговая формы. Штаммы выделены в течение 1973-2002 гг. от больных КЭ людей и лиц с укусом клеща на территории Приморского края Дальнего Востока России.

Методы молекулярного изучения подробно описаны в ранних публикациях [4, 10], они включали в себя выделение вирусной РНК, обратную транскрипцию, полимеразную цепную реакцию, выделение и очистку амплифицированных фрагментов, определение первичной последовательности (секвенирование), анализ нуклеотидных последовательностей Е белка вируса КЭ.

**Результаты и обсуждение**

Полученные нами данные нуклеотидных последовательностей фрагмента 1540-1699 н.о. гена Е дальневосточных штаммов, а также опубликованные в базе данных GeneBank последовательности других известных штаммов вируса КЭ были использованы для поиска сайтов рестрикции, специфичных трем различным субтипам вируса КЭ. По данным В.И. Злобина [11], таким специфичным локусом на этом фрагменте для всех трех субтипов является кодон, расположенный в позиции 206 аминокислотных оснований белка Е. Проведен поиск эндонуклеаз, которые способны расщеплять данный участок. Причем для анализа был выбран более протяженный участок гена Е длиной 509 н.п., включающий проанализированный ранее фрагмент гена Е длиной 160 нуклеотидных оснований (н.о.) [4, 10]. Этот фрагмент у штаммов Sofjin, Neudoerfl и Vasilchenko был исследован с помощью программы Webcutter 2.0 (http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html). Данный участок расположен в позициях 1255-1763 н.о. генома штамма Sofjin, который

фланкируется праймерами № 1766-1768 [10].

В результате анализа нуклеотидных последовательностей указанных фрагментов генома вируса КЭ было обнаружено, что все три штамма, прототипные трем субтипам, можно различить с помощью единственной эндонуклеазы BstDEI, узнающей и расщепляющей сайт C/TNAG *(Рис. 1)*. На рисунке можно видеть, что сайтов узнавания данной эндонуклеазы нет в последовательности штамма Neudoerfl западноевропейского субтипа. Следовательно, этот штамм не будет расщепляться под действием эндонуклеазы BstDEI.

Для сибирского и дальневосточного субтипов сайт рестрикции в позиции 302 является общим. В то же время, по двум другим сайтам в позициях 333 и 431 н.о. можно дифференцировать эти оба субтипа вируса КЭ. Так, для дальневосточного штамма Sofjin предполагаемая картина рестрикции будет представлена тремя фрагментами длиной 30, 176 и 302 н.о., образующимися при расщеплении в сайтах 302 и 333 н.о. Другая картина рестрикции предполагается для штамма сибирского субтипа – Vasilchenko. В этом случае, в результате расщепления эндонуклеазой сайтов 222, 302 и 431 н.о. должны образоваться четыре фрагмента длиной 78, 80, 129 и 222 н.о.

```
          1                                                          60
Sof.      GACCAGAGTGATCGAGGCTGGGGCAACCATTGTGGATTATTTGGAAAAGGCAGCATTGTG
Vas.      GACCAGAGTGACCGAGGCTGGGGCAATCACTGCGGATTATTTGGAAAGGGCAGTATTGTG
Neud.     GATCAGAGTGATCGAGGCTGGGGCAACCACTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTGTG

          61                                                         120
Sof.      ACCTGTGTCAAGGCGTCTTGTGAGGCAAAAAAGAAAGCCACAGGACACGTGTATGACGCT
Vas.      ACCTGCGTCAAGGTGGCCTGTGAGGCAAAGAAGAAGGCCACTGGACATGTGTATGACGCC
Neud.     GCCTGTGTCAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAAAGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCC

         121                                                         180
Sof.      AACAAAATTGTGTACACAGTCAAAGTAGAGCCGCACACGGGGGATTACGTCGCTGCTAAT
Vas.      AACAAGATCGTGTACACCGTTAAGGTTGAGCCACACACGGGGGACTATGTTGCCGCCAAT
Neud.     AACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTTGCCGCAAAC

         181                                                  222    240
Sof.      GAGACTCACAGTGGAAGAAAAACCGCGTCCTTCACGGTTTCCTCGGAGAGGACCATCTTG
Vas.      GAAACCCACAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACGGTCTCCTCAGAAAAAACCATCTTG
Neud.     GAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAATTTCTTCAGAGAAAACCATTTTG

         241                                                         300
Sof.      ACCATGGGAGACTACGGAGACGTGTCCTTGTTATGCAGAGTAGCCAGCGGTGTTGACCTT
Vas.      ACTATGGGGGATTATGGAGATGTGTCCTTGTTGTGCAGAGTCGCCAGTGGCGTTGACTTG
Neud.     ACTATGGGTGAGTATGGAGATGTGTCTTTGTTGTGCAGGGTCGCTAGTGGCGTTGACTTG

         301                                  333                    360
Sof.      GCTCAGACCGTCATCCTGGAGCTTGACAAGACCTCAGAACACCTACCGACGGCCTGGCAG
Vas.      GCTCAGACTGTCATTCTTGAGCTTGATAAGACTCTGGAACACCTTCCGACGGCCTGGCAG
Neud.     GCCCAGACCGTCATCCTTGAGCTTGACAAGACAGTGGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAG

         361                                                         420
Sof.      GTCCACCGGGACTGGTTCAATGATCTGGCCCTACCGTGGAAACATGAAGGGGCACAGAAT
Vas.      GTCCGTCGGGACTGGTTCAATGATCTGGCTCTACCGTGGAAACACGAAGGAGCGCAACAA
Neud.     GTCCATAGGGACTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGAGCGCAAAAC

         421          431                                            480
Sof.      TGGAACAACGCGGAACGGCTGGTTGAGTTTGGAGCTCCACATGCTGTGAAAATGGACGTG
Vas.      TGGAACAATGCTGACCGACTGGTTGAATTTGGAGCTCCGCATGCCGTTAAAATGGATGTG
Neud.     TGGAACAACGCAGAAAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTG

         481                                  509
Sof.      TACAACCTTGGAGACCAGACTGGAGTGTT
Vas.      TATAACCTTGGAGATCAAACTGGGGTGTT
Neud.     TACAACCTCGGAGACCAGACTGGAGTGTT
```

*Рис. 1.* ***Выровненные последовательности фрагмента гена Е штаммов трех субтипов вируса клещевого энцефалита. Дальневосточный субтип вируса с прототипным штаммом Sofjin обозначен Sof., сибирский субтип вируса с прототипным штаммом Vasilchenko обозначен Vas., западный субтип вируса с прототипным штаммом Neudoerfl обозначен Neud. Серым цветом обозначены сайты узнавания эндонуклеазой BstDEI***

В результате расщепления генома с помощью данной эндонуклеазы для штамма каждого субтипа образуется специфичный набор фрагментов различной длины, электрофореграмма которых позволяет провести типирование субтипа вируса КЭ *(Таблица 1)*.

Теоретически можно предположить, что наиболее специфичной областью расщепления штаммов дальневосточного субтипа вируса КЭ должен быть сайт рестрикции 333 н.о., который соответствует позиции 206 а.о. белка Е. Это объясняется тем, что два из пяти нуклеотидных оснований, узнаваемых эндонуклеазой, определяют специфичную для дальневосточного субтипа аминокислоту серин (Ser). В *таблице 2* показано полное

*Таблица 1*

***Предполагаемые результаты расщепления эндонуклеазой BstDEI амплликона длиной 509 н.о. штаммов вируса КЭ***

| Название штамма вируса КЭ | Сайты рестрикции BstDEI (н.о.) | Фрагменты рестрикции BstDEI (н.о.) |
|---|---|---|
| Sofjin | 302, 333 | 31+176+302 |
| Neudoerfl | – | – |
| Vasilchenko | 222, 302, 431 | 78+80+129+222 |

*Примечание: «–» отсутствие сайтов узнавания эндонуклеазой BstDEI в последовательности фрагмента гена Е штамма Neudoerfl*

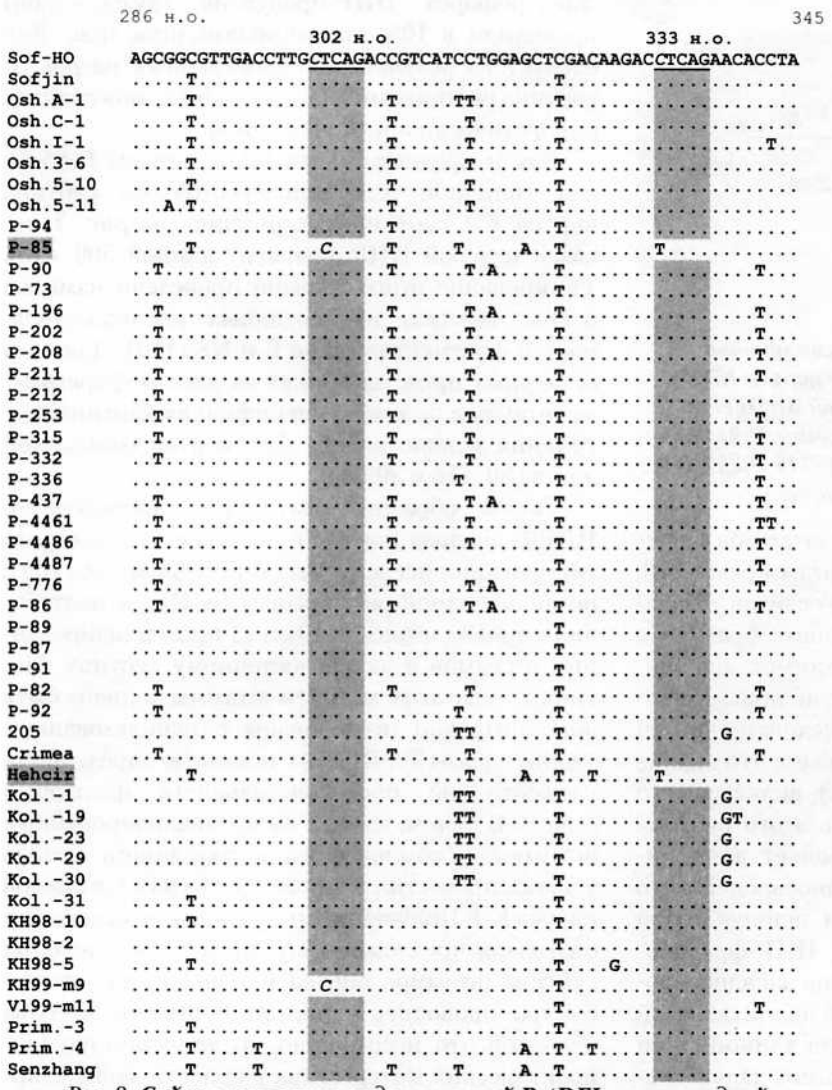



*Рис. 2.* ***Сайты узнавания эндонуклеазой BstDEI нуклеотидной последовательности фрагмента гена Е штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа. Точками показаны нуклеотиды, совпадающие с последовательностью штамма Sofjin-HO (Sof-HO)***

*Таблица 2*

***Нуклеотидные последовательности штаммов вируса КЭ в позициях 333-337 н.о. ПЦР-фрагмента длиной 509 н.о.***

| Сайт рестрикции эндонуклеазой BstDEI | Название штамма | Нуклеотидная последовательность участка ПЦР-фрагмента 333-337 н.о. | Кодируемая субтип-специфичная аминокислота |
|---|---|---|---|
| C/TNAG | Sofjin | C/TCAG | TCA-Ser |
| | Neudoerfl | AGTGG | GTG-Val |
| | Vasilchenko | TCTGG | CTG-Leu |

соответствие последовательности, узнаваемой эндонуклеазой, характерной для штамма Sofjin дальневосточного субтипа. Здесь же представлены отличия последовательности, узнаваемой эндонуклеазой в сайте 333 н.о., и нуклеотидных последовательностей, специфичных штаммам Vasilchenko и Neudoerfl. Следует отметить, что оба сайта рестрикции эндонуклеазой BstDEI в позициях 302 и 333 н.о., характерные для штаммов дальневосточного субтипа вируса КЭ, расположены в области проанализированного нами фрагмента 160 н.о. гена Е.

Используя ранее полученные нами данные по этому фрагменту у 24 дальневосточных штаммов, выделенных от больных КЭ [4, 10], и нуклеотидные последовательности штаммов, взятые из GeneBank, был проведен сравнительный анализ 49 штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа. Нуклеотидные последовательности этих штаммов, приведены на *рис. 2*. Показано, что большинство штаммов (46) содержат два ожидаемых сайта рестрикции для BstDEI. Однако три штамма составили исключение. Так, в первом сайте рестрикции (302 н.о.) штаммы P-85 и KH99-m9 имеют нуклеотидную замену T→C, а во втором сайте (333 н.о.) штаммы P-85 и Hehcir несут замену C→T. Значит, для этих штаммов можно предположить иную, не специфичную штаммам дальневосточного субтипа картину рестрикции. Тем не менее, штамм KH99-m9 все же можно отнести к дальневосточному субтипу, так как он содержит второй сайт рестрикции. В этом случае расщепление будет происходить только в позиции 333 н.о. и картина рестрикции должна быть представлена двумя фрагментами 176 и 333 н.о. Два штамма P-85 и Hehcir не могут быть типированы эндонуклеазой BstDEI и требуют проведения дополнительного анализа с помощью определения первичной последовательности фрагмента генома.

В данном случае, предполагаемая картина рестрикции штаммов P-85 и Hehcir должна совпа-

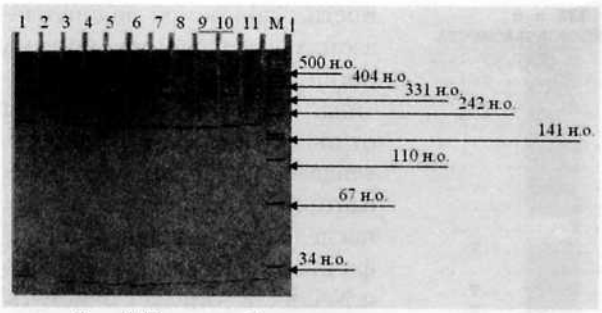



*Рис. 3.* ***Электрофореграмма ампликонов (ПЦР-фрагментов) штаммов вируса КЭ, обработанных эндонуклеазой BstDEI.***
*1-11 дорожкам соответствуют штаммы: Р-91, Р-85, Р-92, Р-336, Р-73, Р-82, Р-212, Р-332, Р-315, Р-253, Р-94; М — маркер молекулярного веса*

дать с картиной, характерной для штаммов западноевропейского субтипа. Как и штамм Neudoerfl, штаммы Р-85 и Hehcir не содержат сайтов узнавания эндонуклеазой BstDEI на данном фрагменте генома. Для дифференциации штаммов западноевропейского субтипа мы провели поиск эндонуклеаз, специфичных для последовательности штамма Neudoerfl. Было обнаружено, что анализ фрагмента CAGTG (332-336 н.о.), включающего специфичный для всех штаммов этого субтипа локус в позиции 206 а.о., позволяет дополнительно типировать штаммы западноевропейского субтипа, обрабатывая ампликоны эндонуклеазой TspRI. В результате обработки ПЦР-фрагмента гена Е длиной 509 н.о. штаммов западноевропейского субтипа вируса КЭ этой эндонуклеазой должны получаться два фрагмента длиной 336 и 173 н.о. Электрофореграмма штаммов дальневосточного и сибирского субтипа вируса КЭ, обработанных таким же образом, предположительно будет представлена целевым ПЦР-фрагментом, так как сайтов узнавания эндонуклеазой TspRI в последовательностях анализируемого участка генома штаммов Sofjin и Vasilchenko не обнаружено. Таким образом, не типируемые с помощью эндонуклеазы BstDEI штаммы Р-85 и Hehcir могли бы быть ошибочно отнесены к западноевропейскому субтипу вируса КЭ, однако дополнительная обработка эндонуклеазой TspRI теоретически позволяет дифференцировать их от штаммов западноевропейского субтипа вируса КЭ.

Для экспериментального подтверждения результатов выше представленного теоретического анализа был проведен ПДРФ-анализ 11-ти штаммов (Р-91, Р-85, Р-92, Р-336, Р-73, Р-82, Р-212, Р-332, Р-315, Р-253, Р-94) вируса КЭ, у которых нуклеотидные последовательности фрагмента гена Е длиной 160 н.о. были определены нами ранее [4, 10]. ПЦР-фрагменты длиной 509 н.о. были очищены и обработаны рестриктазой BstDEI. Электрофорез ПЦР-продуктов (ампликонов) проводили в 10% полиакриламидном геле. Как следует из результатов, приведенных на *рис. 3* картина рестрикции для всех 11 штаммов совпала с теоретически предположенной.

Как и предполагалось выше, штамм Р-85 не дал типичной для дальневосточного субтипа вируса КЭ картины рестрикции (на *рис. 3* показан целевой ПЦР-фрагмент длиной 509 н.о.) Типирование этого штамма проведено нами на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов Е и NS5 [10]. Для всех остальных представленных на электрофореграмме штаммов получена специфичная картина рестрикции в виде набора фрагментов ожидаемой длины 30, 176 и 303 н.о.

Таким образом, результаты проведенного ПДРФ-анализа показали возможность быстрого типирования исследуемых штаммов вируса КЭ с помощью одной рестриктазы BstDEI и подтвердили принадлежность 10 из 11 проанализированных штаммов к дальневосточному субтипу. Нетипируемые этим методом штаммы должны быть дополнительно исследованы с использованием эндонуклеазы TspRI или с помощью определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена Е. В целом, из всех 49 проанализированных штаммов с помощью выше указанного метода удалось провести типирование 46 (94%) штаммов вируса КЭ. Полученные результаты показали, что благодаря предложенному подходу определения субтипа штаммов вируса КЭ можно достаточно быстро проводить скрининг большого массива изолятов, что, несомненно, представляет научно-практический интерес, как в области молекулярной эпидемиологии, так и для диагностических исследований. Кроме того, типирование штаммов вируса КЭ на основе двух реакций (ОТ-ПЦР и рестрикции) без определения нуклеотидной последовательности фрагментов генома значительно сокращает время проведения анализа, финансовые расходы исследователей, а также позволяет получить в короткий срок значительно больше информации о циркуляции тех или иных субтипов в различных ареалах вируса КЭ.

## THE ELABORATION OF THE EXPRESS GENETYPING METHOD OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS WITH THE HELP OF THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM THE RESTRICTIVE FRAGMENTS LENGTHS

N.V. Kulakova, S.I. Belikov, G.N. Leonova

The opportunity of using the analysis of polymorphism the restrictive fragments lengths for genotyping of tick-borne encephalitis virus strains was shown. With the help restrictase BstDEI the belong-

ing of 10 from 11 analysed strains to Far East subtype was confirmed. Nontyping by this method P-85 strain was additionally investigated with the using of endonuclease TspRI. Also the belonging of this strain to Far East subtype of tick-borne encephalitis virus was shown.

**Литература**

1. *Vorndam, V.* A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes / V. Vorndam, G. Kuno, N. Rosado // J. Virol. Methods. — 1994. — Vol. 48. — P. 237-244.

2. *Mota, J.* Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses / J. Mota, J. Ramos-Castaneda, R. Rico-Hesse // Salud Publica Mex. — 2002. — Vol. 44. — P. 228-236.

3. Молекулярная характеристика популяции вируса клещевого энцефалита Южно-Сихотэ-Алиньского очагового региона / Г.Н. Леонова, В.Б. Кожемяко, М.И. Исаева и др. // Вопр. вирусол. — 1996. — № 4. — С. 154-158.

4. Молекулярное типирование штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от людей с различной степенью тяжести инфекции на территории юга Дальнего Востока России / Г.Н. Леонова, С.И. Беликов, Н.В. Кулакова и др. // Журн. мол. генетика, микробиол. и вирусол. — 2004. — №2. — С. 32-37.

5. *Cong, M.* Sequence heterogeneity within three different regions of the hepatitis G virus genome / M. Cong, M.W. Fried, S. Lambert // Virology. — 1999. — Vol. 255. — P. 250-259.

6. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis virus from Siberia and far-eastern Asia / D. Hayasaka, L. Ivanov, G.N. Leonova et al. // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82. — P. 1319-1328.

7. *Marshall, D.J.* Determination of hepatitis C virus genotypes in the United States by cleavase fragment length polymorphism analysis / D.J. Marshall, L.M. Heisler, V. Lyamichev // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 3156-3162.

8. *Harris, E.* Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR / E. Harris, E. Sandoval, A.M. Xet-Mull // J. Virology. — 1999. — Vol. 253. — P. 86-95.

9. *Chandler, L.J.* Multiple genotypes of St. Louis encephalitis virus (Flaviviridae: Flavivirus) circulate in Harris County, Texas / L.J. Chandler, R. Parsons, Y. Randle // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2001. — Vol. 64. — P. 12-19.

10. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента белка оболочки / В.И. Злобин, Т.В. Демина, С.И. Беликов и др. // Вопр. вирусол. — 2001. —№ 1. — С. 16-21.

11. *Кулакова, Н.В.* Молекулярно-генетическая характеристика дальневосточных штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных от людей с различными формами инфекционного процесса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.В. Кулакова. — Владивосток, 2003. — 22 с.