

3. Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Парфенова О.В., Калашникова Н.А., Новикова Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика эпидемически значимых энтеровирусов вида А. Медицинский альманах. 2013, 2(26): 96-99.
4. Демина А.В., Маркович Н.А., Нетесов С.В. Энтеровирусы. Часть 1: история открытия, таксономия, строение генома, эпидемиология. Бюллетень СО РАМН. 2008, 1(129): 92-100.
5. Демина А.В., Нетесов С.В. Энтеровирусы. Часть 2. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений. Бюллетень СО РАМН. 2009, 6(140): 116-125.
6. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм. Инфекция и иммунитет. 2014, 4(1): 27-36.
7. Мартынова Г.П. Энтеровирусная (неполио) инфекция у детей. Сибирское медицинское обозрение. 2014, 3: 100-106.
8. Резайкин А.В., Бурцева Ю.Ю., Усольцева П.С., Шарабрин С.В., Алимов А.В. Энтеровирусная инфекция в Уральском федеральном округе и Западной Сибири в 2017 году (Информационный бюллетень за 2017 год). Екатеринбург, 2018.
9. Устюжанин А.В., Резайкин А.В., Снитковская Т.Э., Скрыбина С.В., Сабитов А.У., Хаматова Ю.Б., Сергеев А.Г. Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 г. Уральский медицинский журнал. 2011, 13(91): 19-24.
10. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции: Методические указания. М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.
11. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004, 5: 150-163.
12. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. J. Gen. Virol. 2017, 98(10): 2421-2422.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

И.В.Хамитова¹, Ю.В.Останкова¹, А.Ю.Антипова¹, А.В.Семенов^{1,2,3}, И.Н.Лаврентьева¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ПАРВОВИРУСА В19, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

¹Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, ²Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, ³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Генотипирование и молекулярно-генетическая характеристика парвовируса В19, циркулирующего на территории Северо-Западного федерального округа. *Материалы и методы.* В работе были использованы образцы сыворотки крови от 821 пациента с макуло-папулезной сыпью, поступившие в Санкт-Петербургский Региональный Центр по надзору за корью и краснухой в 2009-2017 гг., отрицательные по антителам IgM-корь и IgM-краснуха. В настоящем исследовании мы применили генотипирование на основе прямого секвенирования NS1/VP1 области генома парвовируса В19. *Результаты.* ДНК вируса выявлена у 59 (42,4%) серопозитивных больных. Для оценки гетерогенности изолятов были выбраны 14 образцов от пациентов из географически удаленных регионов СЗФО, разного возраста, вне зависимости от пола, с высокой вирусной нагрузкой (10^6 — 10^7 копий/мл). При филогенетическом анализе было показано, что во всех изолятах выявлен только генотип 1А. При этом нуклеотидные последовательности можно разделить на две подгруппы: 13 изолятов (92,8%) относились к подгруппе 1А2, один изолят к подгруппе 1А1. *Заключение.* Внедрение скрининга В19 от пациентов с лихорадкой/сыпью способно представить значимую информацию о распространенности парвовирусной инфекции в Российской Федерации. Выявление новых мутаций вируса и дальнейший анализ их возможных взаимосвязей с течением заболевания может помочь в разработке лекарств, а также в разработке эффективной вакцины против парвовируса В19.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 55—61

Ключевые слова: парвовирус В19, генотипирование, секвенирование, молекулярная эпидемиология

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF PARVOVIRUS B19 ISOLATES CIRCULATING IN THE NORTH-WESTERN FEDERAL DISTRICT

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pavlov State Medical University, ³Mechnikov North-West State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Aim. Genotyping and molecular genetic characteristics of parvovirus B19, circulating in the North-West Federal District. *Material and Methods.* The material of the study is based on serum samples from 821 patients with maculopapular rash negative for antibodies IgM-measles and IgM-rubella were received at the St. Petersburg Regional Center for Measles and Rubella Surveillance in 2009–2017. In the present study we used genotyping by direct sequencing of the NS1/VP1 region of Parvovirus B19 genome. *Results.* DNA of the virus was detected in 59 (42.4%) of seropositive patients. To assess the heterogeneity of isolates, 14 samples were selected from patients from geographically remote regions of the NWFO, of different ages, regardless of gender, with a high viral load (10^6 – 10^7 copies/ml). Based on the phylogenetic analysis of the isolates showed that only the genotype 1A was detected in all isolates. The nucleotide sequences can be divided into two subgroups: 13 isolates (92.8%) belong to the subgroup 1A2, one isolate to the subgroup 1A1. *Conclusion.* The introduction of B19 screening from patients with fever / rash can provide meaningful information on the prevalence of parvovirus infection in the Russian Federation. Identifying new mutations of the virus and further analysis of their possible relationships with the course of the mutation disease can help in the development of medicines, as well as in the development of an effective vaccine against the parvovirus B19.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 55–61

Key words: parvovirus B19, genotyping, sequencing, molecular epidemiology

ВВЕДЕНИЕ

Парвовирус В19 (PVB19) — ДНК-содержащий вирус семейства Parvoviridae, рода Erythrovirus. Инфекция, вызванная PVB19, является антропонозной и убиквитарной. Отмечается высокая выявляемость IgG к парвовирусу В19 в крови разных групп населения на разных территориях в зависимости от возраста: от 2% до 20% у детей младше 5 лет, 15–40% у детей и подростков от 5 до 18 лет и от 40% до 80% у взрослого населения [5]. По некоторым данным среди пожилых людей более 85% серопозитивны по IgG к PVB19 [1].

Геном парвовируса В19 состоит из 5596 нуклеотидов, кодирующих неструктурный белок 1 (NS1), капсидный вирусный белок 1 (VP1) и капсидный вирусный белок 2 (VP2), X-протеин. На основании филогенетического анализа фрагмента уникального участка NS1/VP1 разделяют три генотипа (1, 2 и 3) PVB19, нуклеотидная последовательность которых отличается на 13–14%. Генотипы 1 и 3 подразделяют на субгенотипы 1a и 1b и 3a и 3b, соответственно [12, 15]. Несколько лет назад было предложено разделить субгенотип 1A на подгруппы 1A1 и 1A2 [9]. При этом явных различий в клинических проявлениях и тяжести течения заболевания при инфицировании разными генотипами не выявлено [12]. Хотя в ряде работ представлены доказательства того, что некоторые осложнения могут быть связаны с определенными вирусными генотипами [11].

Для разных генотипов вируса характерно преимущественно географическое распределение. Так, генотипы 1 и 2 встречаются в Европе, США и других западных странах, тогда как генотип 3 циркулирует на территории Африки к югу от Сахары и Южной Америки [2, 11]. При этом парвовирус В19 генотипа 1 в настоящее время распространен повсеместно, о случаях обнаружении парвовируса В19 генотипа 3 во Франции, Греции, Великобритании сообщают в последние десятилетия, а генотип 2 регистрируют при ретроспективных молекулярно-генетических исследованиях материала, собранного до 1973 года [3, 6, 10, 12]. Последнее обстоятельство позволило

предположить, что PVB19 генотипа 2 перестал циркулировать, однако необходимы дальнейшие подтверждения этого.

Несмотря на то, что PVB19 является ДНК-содержащим вирусом, он демонстрирует высокую скорость нуклеотидных замен (скорость замещения до 4×10^{-4} замен на сайт в год), сравнимую со скоростью нуклеотидных замен, характерной для РНК-содержащих вирусов. Но при этом уровень гомологии с прототипными штаммами остается высоким [4, 10, 13]. Таким образом, в геноме PVB19 накапливаются мутации, которые могут иметь значительные последствия для появления новых генотипов, что может привести к появлению геновариантов с измененной вирулентностью или тканевым тропизмом, а в конечном итоге повлиять на развитие заболевания и передачу вируса. Что и было показано: генетическая дивергенция В19 может происходить двумя путями — динамическая замена штаммов и постепенные изменения, состоящие из накопления точечных мутаций [14].

Целью нашей работы было генотипирование и молекулярно-генетическая характеристика парвовируса В19, распространенного на территории Северо-Западного федерального округа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были исследованы образцы крови от 821 пациента с макуло-папулезной сыпью, поступившие в Санкт-Петербургский Региональный Центр по надзору за корью и краснухой в 2009-2017 гг., отрицательные по антителам IgM-корь и IgM-краснуха.

Антитела к парвовирусу В19 класса IgM и IgG определяли методом ELISA с помощью тест-систем EUROIMMUN, Германия в соответствии с инструкцией производителя.

Нуклеиновые кислоты из плазмы крови выделяли с использованием набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Для выделения ДНК парвовируса В19 использовали диагностический набор «АмплиСенс® Parvovirus В19-FL» производства ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва), в соответствии с инструкцией производителя. Для амплификации с дальнейшим секвенированием применяли специфические праймеры (Синтол, Россия). Подбор праймеров осуществлялся на основании литературных данных с помощью программы NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям.

Использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент, включающий locus, который кодирует неструктурный белок NS1 и уникальную вариабельную область структурного белка VP1 (NS1 — VP1u) следующей структуры: ParvoB19 1F CAATTGTCACAGACACCAGTA; ParvoB19 2F CCCGCGCTCTAGTACGCCA; ParvoB19 1R ACTTAGCCAGTTGGCTATACCT; ParvoB19 2R TTGCGGGGGCCAGCTTGTA. Этот фрагмент наиболее полно характеризует филогенетическое положение изолятов парвовируса В19.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), в трех повторях, на прямых и обратных праймерах. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок денатурировали в формамиде и помещали в генетический анализатор ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [8]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей, позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» (Neighbor-joining), для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 500 повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антитела к парвовирусу В19 класса IgM и IgG выявлены в 139 (16,9%) случаях. ДНК вируса выявлена у 59 (42,4%) серопозитивных больных, в 54 образцах вирусная нагрузка превышала 10^4 копий/мл.

Для оценки гетерогенности изолятов были выбраны 14 образцов от пациентов из географически удаленных регионов СЗФО, разного возраста, вне зависимости от пола, с высокой вирусной нагрузкой (10^6 – 10^7 копий/мл).

При филогенетическом анализе было показано, что во всех изолятах, проанализированных в этом исследовании, выявлен только генотип 1А. При этом нуклеотидные последовательности можно разделить на две подгруппы: 13 изолятов (92,8%) относились к подгруппе 1А2, один изолят к подгруппе 1А1. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рис.

Сравнение нуклеотидных последовательностей различных штаммов показало высокий уровень идентичности. При попарном сравнении нуклеотидная идентичность изолятов в подгруппе 1А2 варьировала от 98,3 до 100%.

При сравнении с референсными изолятами, загруженными в международной базе данных GenBank, в нуклеотидных последовательностях были обнаружены нуклеотидные мутации. Выявленные изменения нуклеотидных последовательностей в сравнении с референсными представлены в табл. 1.

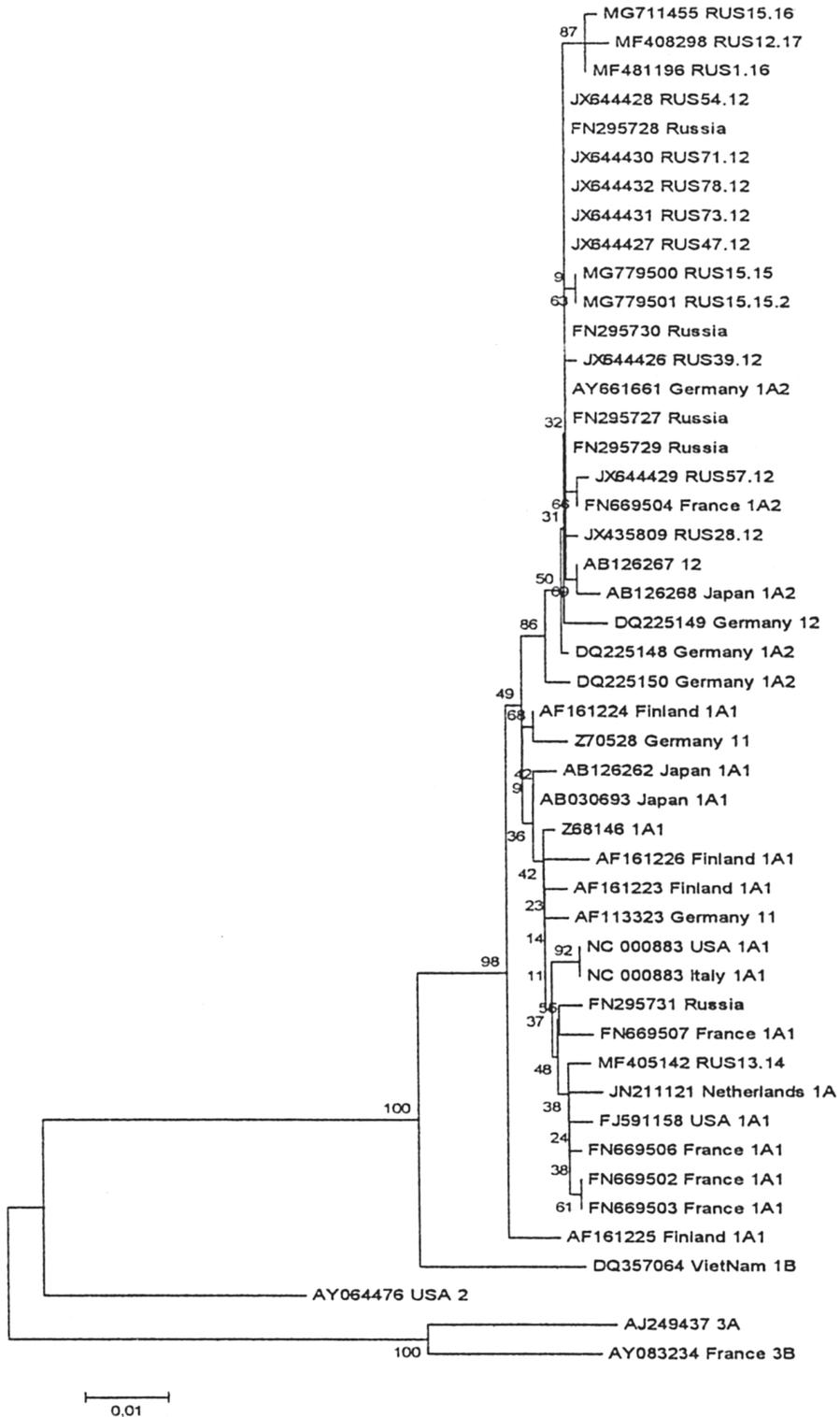
В обследуемом регионе гена NS1 были выявлены аминокислотные замены F554L в изолятах MF481196, MG711455, MF408298, JX644429 и F554S в изоляте MF405142 по сравнению с референсным изолятом NC_000883. В гене VP1 также были выявлены аминокислотные замены, представленные в табл. 2.

Таблица 1. Мутационные замены в нуклеотидных последовательностях в сравнении с референсным изолятом NC_000883

№ нуклеотида	2277	2278	2327	2423	2426	2471	2534	2600	2688	2691	2713	2754	2760	2778	2800	2820	2918	2944	2996
Изолят																			
NC_000883	T	T	A	G	G	C	G	G	G	A	C	T	C	T	C	T	A	A	A
JX644429	C								T						T				
RUS57.12																			
MF405142		C	G		A	T	A			G	G		T			C	G	G	
RUS13.14																			
MF481196	C			T				A											
RUS1.16																			
MG711455	C			T				A				C							
RUS15.16																			
MG779500										G									
RUS15.15																			
MG779501										G									
RUS15.15.2																			
MF408298	C			T				A						C					C
RUS12.17																			

Таблица 2. Мутационные замены в аминокислотных последовательностях гена VP1 в сравнении с референсным изолятом NC_000883

Изоляты	Мутации					
	E14K	Q21H	V30L	S98N	D107N	Q124P
JX644429	Да	Да	Да	Да	Да	-
MF408298	Да	-	Да	Да	Да	Да
MF405142	Да	-	-	-	-	-
MG711455	Да	-	Да	Да	Да	-
MF481196	Да	-	Да	Да	Да	-
MG779501	Да	-	Да	Да	Да	-
MG779500	Да	-	Да	Да	Да	-



Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными от пациентов, проживающих в Северо-Западном федеральном округе, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.

Полученное нами абсолютное преобладание генотипа 1 в обследованной группе согласуется с результатами работ других исследователей, согласно которым генотип 1 является наиболее распространенным геновариантом РVВ19 в мире.

Последовательности, полученные в этом исследовании, тесно связаны с обнаруженными ранее. Так, изолят JX435809, полученный от пациента с сыпью и лихорадкой, характерных для кори и краснухи в 2011 году идентичен изоляту FN825874, выявленному в Витебске, Республика Беларусь, в 2007 году от пациента со схожими симптомами. Изоляты JX644426-JX644428, JX644430-JX644432, идентичны различным изолятам из Республики Беларусь, Германии, Люксембурга и Нидерландов. Изолят JX644429 сходен с описанным в Израиле изолятом FN295680. Изоляты MF405142, MG779500, MG779501 сходны с различными изолятами из Нидерландов и Эстонии, MF481196, MG711455, MF408298 с изолятом из Албании, однако в нуклеотидных последовательностях выявлены уникальные мутации, не представленные в последовательностях, загруженных в GenBank.

Таким образом, были выявлены изоляты, широко представленные по всему миру, а также изоляты, характерные для Северо-Запада Евразийского континента. Все эти случаи были обнаружены в 2010-2011 гг. среди наших пациентов и в 2005-2011 гг. в работах других исследовательских групп, что свидетельствует о продолжающейся вирусной циркуляции. Однако некоторый уровень кластеризации вирусов по годам может указывать на повторные вирусные ввозы или обновляющийся резервуар патогена. Изоляты, выявленные нами в 2014-2017 гг., продемонстрировали уникальные нуклеотидные и аминокислотные замены, не представленные ранее в международной базе GenBank, в том числе единственный изолят, полученный в 2014 году и относящийся к подгруппе В19 1А1. Учитывая, что белки анализируемого региона играют важную роль в репликации вирусной ДНК, вызывая нейтрализацию антител, отвечающих за элиминацию вируса, и индуцируют пожизненный иммунитет, необходимы дальнейшие исследования для выяснения значимости этих мутаций.

Внедрение скрининга В19 от пациентов с лихорадкой/сыпью способно предоставить значимую информацию о распространенности парвовирусной инфекции в Российской Федерации. Выявление новых мутаций вируса и дальнейший анализ их возможных взаимосвязей с течением заболевания мутаций может помочь в разработке лекарств, а также в разработке эффективной вакцины против парвовируса В19.

Систематическое применение молекулярной филогенетики при анализе изолятов парвовируса В19 будет способствовать пониманию эпидемиологии инфекционного процесса, выявлению особенностей распространения вируса и его геновариантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Broliden K., Tolfvenstam T., Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J. Intern. Med.* 2006, 260(4): 285-304.
2. Candotti D., Etiz N., Parsyan A. et al. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004, 78: 2169-2178.
3. Cohen B.J., Gandhi J., Clewley J.P. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J. Clin. Virol.* 2006, 36(2): 152-155.
4. Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 2008, 9: 267-276.
5. Gallinella G., Venturoli S., Manaresi E. et al. B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *J. Clin. Virol.* 2003, 28(1):1-13.
6. Hübschen J.M., Mihneva Z., Mentis A.F. et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47(11): 3735-3738.
7. Kühl U., Lassner D., Pauschinger M. et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Med. Virol.* 2008, 80(7):1243-1251.
8. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution.* 2016, 33(7):1870-1874.
9. Molenaar-de Backer M.W., Lukashov V.V., van Binnendijk R.S. et al. Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions. *PLoS One.* 2012, 7(8): e43206.

10. Norja P., Hokynar K., Aaltonen L.M. et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103(19):7450-7453.
11. Sanabani S., Neto W. K., Pereira J. et al. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 604-606.
12. Servant A., Laperche S., Lallemand F. et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.* 2002, 76: 9124-9134.
13. Shackelton L.A., Holmes E.C. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J. Virol.* 2006, 80: 3666-3669.
14. Suzuki M., Yoto Y., Ishikawa A. et al. Analysis of nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome reveals two different modes of evolution, a gradual alteration and a sudden replacement: a retrospective study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008. *J. Virol.* 2009, 83:10975-10980.
15. Toan N.L., Duechting A., Kremsner P.G. et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J. Gen. Virol.* 2006, 87: 2941-2949.

© Т.Ф.СТЕПАНОВА, 2018

Т.Ф. Степанова

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ПОДХОДА К АНАЛИЗУ АКТИВНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИКИ ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии

Цель. Оценка эффективности разработанного нового подхода к анализу активности эпидемического процесса и результативности профилактики паразитарных заболеваний, опирающегося на систему многоуровневого мониторинга. *Материалы и методы.* Проанализированы данные официального статистического наблюдения за 2010-2016 гг. по всем субъектам Российской Федерации. Для поиска закономерностей в больших объемах данных применена технология Data Mining. *Результаты.* Проведенный анализ позволил охарактеризовать активность эпидемического процесса паразитарных заболеваний на территории России. Применение методов математического моделирования позволило сформировать прогноз заболеваемости/пораженности по результатам санитарно-паразитологических исследований. Выявлены регионы, в которых недостаточное качество санитарно-паразитологических исследований привело к расхождениям фактической и предсказанной пораженности. *Выводы.* Проведенное исследование позволило установить, что разработанный подход эффективен для оценки активности эпидемического процесса и результативности профилактики паразитарных заболеваний, структурирования статистической информации по регионам и нозологиям, выявления тенденций заболеваемости, разработки региональных программ профилактики.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 61—65

Ключевые слова: анализ активности эпидпроцесса, оценка результативности профилактики паразитарных болезней

Т.Ф. Степанова

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF A NEW APPROACH TO THE ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE EPIDEMIC PROCESS AND THE PERFORMANCE OF PREVENTION OF PARASITARY DISEASES

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Russia

Aim. Evaluate the effectiveness of the developed new approach to the analysis of the activity of the epidemic process and the effectiveness of the prevention of parasitic diseases, based on a multi-level monitoring system. *Materials and methods.* The data of official statistical observation for 2010-2016 are analyzed for all subjects of the Russian Federation. To search for the regularities in large volumes of data, Data Mining is used. *Results.* The analysis made it possible to characterize the activity of the epidemic process of parasitic