ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья
https://doi.org/10.36233/0372-9311-423

Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования

Надтока М.И.✉, Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афонина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирус ветряной оспы (VZV) — возбудитель одноимённого заболевания и опоясывающего лишая, филогенетически подразделяется на 8 клад, для распространения которых характерна географическая привязка к тем или иным регионам мира. Для большинства стран установлены циркулирующие на их территориях клады VZV, однако для России аналогичная информация практически отсутствует.

Цель исследования — разработка эффективной методики типирования VZV с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования для выявления распространённости различных клад VZV в Москве, Московской области и Ставропольском крае.

Материалы и методы. Для генотипирования VZV достаточно задействовать 7 нуклеотидных позиций, по уникальным сочетаниям которых возможно отнести вирус к одной из клад. Короткие участки нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания получали при помощи разработанного набора праймеров.

Результаты. Разработана и оптимизирована методика генотипирования VZV. При помощи данной методики получены первичные данные о распределении клад VZV в исследуемых регионах. Таким образом, было установлено, что в Москве и ряде других регионов распространены преимущественно 1, 3 и 5-я клады VZV.

Заключение. Разработанная методика, включающая праймерную панель и алгоритм генотипирования, позволяет произвести типирование VZV в короткие сроки при снижении затрат на пробоподготовку и одновременном увеличении количества образцов в одном цикле секвенирования. Результаты, полученные с использованием данного протокола, позволяют сделать предположение о том, что в Москве, Московской области и Ставропольском крае наибольшую представленность имеют клады 1, 3 и 5 VZV. Для подтверждения данной гипотезы требуется включить в последующие исследования большее количество клинических образцов, в том числе из других регионов страны.

Ключевые слова: *вирус ветряной оспы, VZV, генотипирование вируса ветряной оспы, генотипирование VZV, секвенирование следующего поколения, высокопроизводительное секвенирование*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 124 от 24.05.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Надтока М.И., Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афонина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(5):267–275.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-423
EDN: https://www.elibrary.ru/tkklhp

© Надтока М.И., Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афонина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г., 2023

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2023; 100(5)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-423
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-423

Studying the genetic diversity of the varicella-zoster virus in selected regions of the Russian Federation using high-throughput sequencing

Maksim I. Nadtoka✉, Vladislav G. Lysenkov, Matvei R. Agletdinov, Andrey A. Mishkin, Natalia M. Afonina, Antonina A. Ploskireva, Irina V. Mikheeva, Kamil F. Khafizov, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Varicella-zoster virus (VZV), the causative agent of the disease of the same name and herpes zoster, is phylogenetically divided into 8 clades, the distribution of which is characterized by geographic reference to certain regions of the world. For most countries, VZV clades circulating in their territories have been identified, however, such information is almost unavailable for Russia.

The **purpose** of the study is to develop an effective method for VZV typing using high-throughput sequencing technologies to identify the prevalence of various VZV clades in Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory.

Materials and methods. To genotype VZV, it is enough to refer to 7 nucleotide positions. Their unique combinations can be used to assign the virus to one of the clades. Short sections of nucleotide sequences of open reading frames were obtained using a developed set of primers.

Results. A VZV genotyping technique has been developed and optimized. Using this technique, primary data on the distribution of VZV clades in the studied regions have been obtained. Thus, it has been established that in Moscow and a number of other regions, the 1st, 3rd, and 5th clades of VZV are predominantly distributed.

Conclusion. The developed technique, including a primer panel and a genotyping algorithm, allows VZV typing in a short time while reducing specimen preparation costs and simultaneously increasing the number of specimens in one sequencing cycle. The results obtained using this assay allow us to assume that in Moscow, Moscow Region, Stavropol Territory, VZV, clades 1, 3, and 5 are the most represented ones. To confirm this hypothesis, it is necessary to include a larger number of clinical specimens in subsequent studies, including from other regions of the country.

Keywords: *varicella zoster virus, VZV, genotyping of varicella zoster virus, VZV genotyping, next generation sequencing, high-throughput sequencing*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 124, May 24, 2022).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Nadtoka M.I., Lysenkov V.G., Agletdinov M.R., Mishkin A.A., Afonina N.M., Ploskireva A.A., Mikheeva I.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G. Studying the genetic diversity of the varicella-zoster virus in selected regions of the Russian Federation using high-throughput sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(5):267–275.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-423
EDN: https://www.elibrary.ru/tkklhp

Введение

Вирус ветряной оспы (Varicella-Zoster virus, VZV) относится к семейству *Herpesviridae*, роду *Varicellovirus*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*. Характерными чертами представителей данного подсемейства являются короткий репродуктивный цикл, быстрое распространение и эффективное разрушение инфицированных клеток. VZV способен реплицироваться в ограниченном спектре организмов-хозяев, который включает исключительно клетки человеческого и обезьяньего происхождения. Ежегодная заболеваемость ветряной оспой (ВО) колеблется от 13 до 16 случаев на 1000 человек с существенными вариациями по годам. В странах с умеренным климатом заболеваемость ВО, в зависимости от возраста, наиболее высока среди детей дошкольного (1–4 года) или младшего школьного возраста (5–9 лет) и составляет более 100 случаев на 1000 детей в год. Таким образом, более 90% людей заражаются до подросткового возраста,

© Nadtoka M.I., Lysenkov V.G., Agletdinov M.R., Mishkin A.A., Afonina N.M., Ploskireva A.A., Mikheeva I.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G., 2023

и лишь небольшая часть взрослых (< 5–10%) остаётся восприимчивой к заболеванию. В тропическом климате заражение происходит в более высоком общем среднем возрасте, при этом доля случаев заболевания среди взрослых выше [1, 2].

Инфицирование VZV имеет ярко выраженный сезонный характер, пик заболеваемости приходится на зимний и весенний периоды, при этом с периодичностью 2–3 года происходят вспышки заболеваемости. В развитых странах 5 из 1000 больных ВО госпитализируются, а 2–3 случая заболевания на 100 тыс. инфицированных заканчиваются летально [2]. В довакцинальную эпоху ВО являлась повсеместно встречающейся детской инфекцией в странах с умеренным климатом. К примеру, в США порядка 98% населения к возрасту 20 лет были сероположительны к VZV.

Первая живая аттенуированная вакцина (vОка) против данного возбудителя была получена в 1974 г. путём серии пассажей клинического изолята VZV (Ока) дикого типа. Позднее данная вакцина была усовершенствована, в результате был выпущен препарат «Varivax» («Merck Sharp & Dohme Corp.») [3]. Живая аттенуированная вакцина состоит из смеси различных геновариантов VZV, содержащих 42 однонуклеотидных полиморфизма, которые отличают vОка от родительского штамма Ока дикого типа [2]. Благодаря разработанной вакцине и введению в разных странах обязательных программ вакцинации против VZV, госпитализация и смертность от ВО среди детей снизилась более чем на 90% [2, 3].

Геном вируса ветряной оспы

Как и все герпесвирусы, VZV является двуцепочечным ДНК-вирусом и имеет геном размером 125 000 п.н., включающий 72 открытые рамки считывания (ORF), образующие 71 ген. Поскольку 3 гена представляют из себя копии других генов, то геном содержит 68 уникальных генов. Геном вируса состоит из двух основных кодирующих областей: уникальной длинной (U_L) и уникальной короткой (U_S). Регион U_L фланкирован короткими (около 88 п.н.) инвертированными повторами TR_L и IR_L, тогда как область U_S окружена длинными (7319 п.н.) повторами TR_S и IR_S. Пять участков генома содержат тандемные прямые повторы (R1, R2, R3, R4 и R5), которые представляют собой короткие последовательности с высоким содержанием G + C [4, 5]. Три из этих повторяющихся последовательностей (R1, R2 и R3) расположены в кодирующей области генов *ORF11*, *ORF14* и *ORF22* соответственно и, таким образом, могут оказывать влияние на функции белков. Две копии R4 находятся внутри повторов IR и TR, соседних с точкой начала репликации (OriS), а R5 расположен между ORF60 и ORF61 [5].

Генотипирование VZV

До 2008 г. не существовало единой номенклатуры для типирования VZV. Ранняя классификация VZV была основана на результатах анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Маркеры ПДРФ, задействованные в данных исследованиях, включали полиморфизм ORF38 (PstI), ORF54 (BglI) и ORF62 (SmaI) [6, 7]. Таким образом, большинство штаммов дикого типа из США и Европы были охарактеризованы как $PstI^+BglI^-$; штаммы, распространённые на территории Азии и Африки, — как $BglI^+$; Ока-подобные штаммы дикого типа из Японии — как $PstI^+/PstI^-BglI^+SmaI^-$; вакцинные штаммы Ока — как $PstI^-BglI^+SmaI^+$ [7, 8].

Предпринимались попытки идентификации вариантов VZV при помощи полногеномного скрининга на наличие однонуклеотидных замен посредством гетеродуплексной мобильности. Данный подход использовался для оценки замен в ORF1, ORF21, ORF50 и ORF54, что позволило выделить 4 основные клады (геноварианта), названные A, B, C и J. В кладе A кластеризовались штаммы из Африки и Азии, тогда как клады B и C преимущественно состояли из европейских штаммов. Впоследствии к этой схеме генотипирования была добавлена клада J для учёта японских штаммов [9, 10].

Другой подход к генотипированию основывается на анализе однонуклеотидных полиморфизмов в последовательностях генов 5 гликопротеинов (gH, gI, gL, gB, gE), а также основного гена трансактиватора IE62. Благодаря этому штаммы VZV были классифицированы в 4 клады: A, B, C и D. Клады A и D были представлены изолятами, отобранными на территории Северной Америки и Европы, клады B и C состояли из представителей VZV, распространённых на территории Сингапура и Японии соответственно [11, 12]. Необходимо отметить, что хотя номенклатура клад из данного исследования во многом схожа с номенклатурой, использованной в работах W. Barrett-Muir и соавт. [8, 9], она не имеет корреляции между рассматриваемыми методами типирования.

Более поздние филогенетические анализы, включающие как полные геномы VZV, так и их фрагменты, позволили соотнести геномные вариации со специфичными геновариантами и предположительно рекомбинантными вирусами. Посредством мультилокусного анализа полиморфизмов в геномных последовательностях VZV были выделены 3 основных геноварианта (клады): E (Европейский), J (Японский) и M (мозаичный) [13]. Впоследствии геновариант M был разделён на 4 отдельных варианта: M1, M2, M3, M4 [13, 14]. Принадлежащие к геновариантам M1 и M2 штаммы были наиболее распространены в тропических регионах, геновариант E — в умеренных широтах, геновариант J — в Японии. В отдельных исследо-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2023; 100(5)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-423

ваниях штамм с геновариантом M3 был обнаружен в США, а штаммы с геновариантом M4 — в Испании и Франции [14, 15].

Поскольку номенклатура клад/геновариантов VZV была основана на различных методах молекулярного типирования, в 2008 г. была введена новая универсальная номенклатура, разделяющая геноварианты на 5 основных клад (1–5) с 2 условными (кандидатными) кладами (VI и VII) [16]. Также теперь для выделения VZV в отдельную кладу необходимо, чтобы к ней относились как минимум 2 представителя, для которых получены последовательности полного генома. В ином случае такая клада считается кандидатной и обозначается римскими цифрами.

Благодаря секвенированию полных геномов из клинических образцов VZV, взятых на территории Германии, были обнаружены как штаммы, принадлежащие к кладам 1, 3 и 5, так и штаммы, которые не относились ни к одной из известных клад. Поэтому данные представители (1483/2005 и 457/2008) были выделены в отдельные кандидатные клады — VIII и IX соответственно [17]. Позднее, в ходе работы по исследованию событий рекомбинации между представителями различных клад VZV, был обнаружен штамм, который сгруппировался с единственным представителем клады VI на филогенетическом древе. Таким образом, в 2015 г. кандидатная клада VI была преобразована в основную кладу 6 [18]. В 2017 г. ранее использовавшаяся схема генотипирования VZV была усовершенствована, за счёт чего удалось выявить новых представителей кандидатной клады IX (одного полного и одного частичного генома). При этом ранее был идентифицирован и описан только один изолят, принадлежащий к данной кладе (JN704710). Наличие полной последовательности генома изолята KY037798, идентифицированного в данном исследовании, соответствовало требованию к преобразованию кандидатной клады IX в основную кладу 9 [19].

На сегодняшний день разнообразие VZV представлено 8 кладами: 7 основных (1–6 и 9) и 1 кандидатная клада VIII; клада VII стала неактуальной ввиду отсутствия новых изолятов. Основные клады VZV, как правило, имеют географическую привязку к определённым регионам. В частности, клады 1, 3 и 6 в основном распространены в Европе, Северной Америке и Австралии, клада 2 — преимущественно в Азии. Клады 4 и 5, как правило, имеют распространение во множестве регионов по всему миру; клада 5 является единственной, о циркуляции которой сообщается в Африке [20]. Несмотря на обширное количество информации о циркулирующих по всему миру кладах VZV, распределение клад VZV в России не освещено в достаточной степени. В научной литературе практически отсутствует актуальная информация по данной теме. Сообщается, что в северном регионе Китая Синьцзян, который граничит с Россией, преобладают клады 1 и 3 [21].

В качестве первого шага к получению достоверных данных о циркулирующих на территории России представителях различных клад VZV нами была разработана специфичная праймерная панель, позволяющая типировать VZV в соответствии со схемой, предложенной N.J. Jensen и соавт. [19]. Панель включает 6 пар праймеров, охватывающих короткие (порядка 200 п.н.) области открытых рамок считывания: ORF21, ORF22, ORF 29, ORF38, ORF55, ORF67, которые содержат 7 однонуклеотидных замен, по уникальным композициям которых возможно определить принадлежность вируса к одной из известных клад. Благодаря модификации праймеров путём объединения с адаптерными последовательностями Nextera в совокупности с возможностью секвенирования получаемых ДНК-библиотек на платформе «Illumina» с наборами реагентов для коротких прочтений, удаётся получить результаты типирования в течение 48 ч. Таким образом, разработанная праймерная панель позволяет сократить финансовые и временны́е затраты при единовременном увеличении количества образцов в одном запуске прибора для высокопроизводительного секвенирования.

Разработанное нами решение, предназначенное для быстрого скрининга большого числа клинических образцов, было протестировано на образцах из Москвы, Московской области и Ставропольского края, что позволило рассмотреть представленность VZV в отдельных регионах РФ в первом приближении.

Материалы и методы

Образцы VZV

В исследовании использованы 75 образцов VZV, собранных в период с июня 2022 г. по июль 2023 г. Клинические образцы вирусов были получены от пациентов преимущественно из Москвы (61 образец), а также из Московской области (9 образцов) и Ставропольского края (5 образцов). Забор биологического материала производили после получения добровольного информированного согласия пациентов или их представителей. Проводимое исследование одобрено на заседании Локального этического комитета ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора от 24.05.2022 (протокол № 124).

Выделение ДНК и получение фрагментов геномов VZV

Вирусную ДНК выделяли из клинических образцов с использованием набора реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс»). Полученную ДНК затем использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР с целью амплификации фрагментов

генома VZV. Области открытых рамок считывания (ORF21, ORF22, ORF 29, ORF38, ORF55, ORF67), содержащие дискриминирующие мутации, в соответствии с которыми возможно произвести типирование VZV, получали при помощи разработанного набора праймеров (**табл. 1**), смешанных в пул (**табл. 2**).

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси со следующим составом: 10 мкл ПЦР-смесь-2 blue («АмплиСенс»), 1,8 мкл 4,4 мМ дезоксинуклеозидтрифосфата («АмплиСенс»), 1 мкл смеси праймеров, 5 мкл ДНК-матрицы; до требуемого объёма реакционную смесь доводили H_2O mQ. Для амплификации использовали следующий температурно-временной протокол: 95ºС — 2 мин; затем 40 циклов: 95ºС — 15 с, 60°С — 30 с, 72ºС — 1 мин; финальная элонгация: 72ºС — 3 мин. Целевые фрагменты геномов VZV идентифицировали по свечению бромистого этидия в 1,7% агарозном геле. Визуализацию результатов электрофоретического анализа проводили при помощи «GelDoc EZ» («Bio-Rad»).

Таблица 1. Список праймеров, используемых для амплификации фрагментов генома VZV
Table 1. List of primers used to amplify VZV genome fragments

Праймер Primer	Последовательность праймера с адаптерной последовательностью Nextera (5'→3') Primer sequence with Nextera adapter sequence (5'→3')
VZV_1_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgcggttttaacttcacaatgtaat
VZV_1_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGctcatctggacgaagcca
VZV_2.2_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGttacccacaagcacgtcag
VZV_2.2_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGtcatcaaaccatgttaaccctc
VZV_3_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGaatatgttacggggacctttga
VZV_3_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcaaacaccccaataggttga
VZV_4_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgccatataccgcaacaactg
VZV_4_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcctcgccataaagccactac
VZV_5_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGccaccacggtggactatg
VZV_5_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGgaggagaccgtacgcga
VZV_6_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGctttgatcttcaagggcgac
VZV_6_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcgctatagtttgtcccggt

Примечание. Прописными буквами обозначены адаптерные последовательности Nextera, «сшитые» с праймерами (обозначены строчными буквами).
Note. Capital letters indicate Nextera adapter sequences fused to primers (indicated in lower case letters).

Таблица 2. Состав смеси праймеров для типирования VZV
Table 2. Composition of the mixture of primers for VZV typing

Праймер Primer	Концентрация праймеров в стоке, пмоль/мкл Primer concentration in mix, pmol/μl	Концентрация после разведения в 2 раза, пмоль/мкл Concentration after 2-fold dilution, pmol/μL
VZV_1_fwd	10,7	5,35
VZV_1_rev	10,7	5,35
VZV_2.2_fwd	7,1	3,55
VZV_2.2_rev	7,1	3,55
VZV_3_fwd	10,7	5,35
VZV_3_rev	10,7	5,35
VZV_4_fwd	9,5	4,75
VZV_4_rev	9,5	4,75
VZV_5_fwd	7,1	3,55
VZV_5_rev	7,1	3,55
VZV_6_fwd	4,7	2,35
VZV_6_rev	4,7	2,35

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2023; 100(5)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-423

Подготовка библиотек для секвенирования

Очистку ПЦР-продукта от реакционной смеси осуществляли с использованием «AMPureXP beads» («Beckman Coulter») в соотношении 1 : 0,8 (образец : частицы). Праймеры, используемые для амплификации сегментов генома VZV, модифицированы путём совмещения с адаптерами «Nextera» («Illumina»), в результате чего получаемые ампликоны оказываются фланкированы специфичными последовательностями, облегчающими процесс подготовки библиотек. Баркодирование проводили с использованием 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue («АмплиСенс»), 1 мкл EvaGreen («Biotium») в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя, 2 мкл каждого из баркодов (5 пмоль) и 8 мкл очищенного ПЦР-продукта. Для баркодирования использовали следующий температурно-временной протокол: 98ºС — 30 с; 12 циклов: 98ºС — 10 с, 65ºС — 1 мин 15 с. Концентрацию ДНК после баркодирования измеряли на флуориметре «Qubit 4.0» с использованием набора «Qubit dsDNA HS Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific»). Готовые библиотеки были объединены и очищены при помощи магнитных частиц «AMPureXP beads» («Beckman Coulter»). Длины готовых библиотек идентифицировали с использованием системы автоматизированного электрофореза «2100 Bioanalyzer» («Agilent Technologies»).

Секвенирование библиотек VZV

Секвенирование осуществляли на платформе «Illumina MiSeq» с использованием набора реагентов «MiSeq Reagent Kit v2» (300 циклов) и «MiSeq Reagent Kit v3» (600 циклов). При этом на один образец отводилось менее 0,5% запуска «MiSeq».

Определение последовательностей ДНК и геновариантов образцов

После получения «сырых» данных с прибора прочтения ДНК были триммированы от вышеописанных праймерных последовательностей с помощью программного инструмента *fastp 0.23.0* [22]. Далее с помощью *bwa 0.7.17* [23] прочтения были выровнены («картированы») на референсную последовательность вируса *NC_001348.1*, отсортированы и индексированы с помощью *samtools 1.15.1* [24]. Получившиеся выравнивания были представлены в виде черновых сборок генома с помощью *samtools 1.15.1* и собственного скрипта, после чего перекартированы с помощью *MAFFT v7.490* [25] для получения финальных сборок (консенсусных последовательностей).

Согласно вышеупомянутой номенклатуре вирусных клад [19], для успешного генотипирования достаточно задействовать всего 7 позиций, сочетание вариантов (однонуклеотидных замен) в которых указывает на ту или иную кладу (**табл. 3**). Сконструированные нами праймеры (табл. 1) составлены таким образом, чтобы включать данные варианты.

Результаты

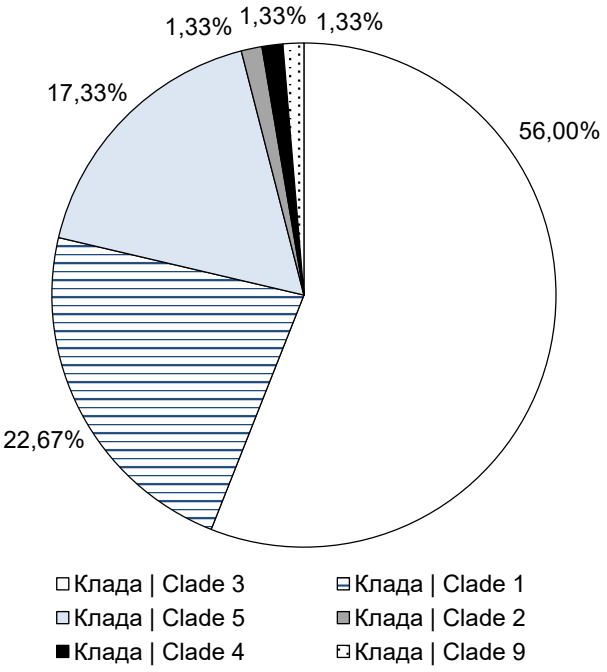
Разработанная нами праймерная панель, описанная в предыдущем разделе, охватывает короткие сегменты 6 открытых рамок считывания: ORF21, ORF22, ORF29, ORF38, ORF55 и ORF67, которые содержат однонуклеотидные замены, являющиеся целевыми для осуществления типирования VZV. С использованием данной панели нами было произведено секвенирование клинических образцов VZV, полученных от пациентов из Москвы, Московской области и Ставропольского края. Полученные

Таблица 3. Схема генотипирования, предложенная N.J. Jensen и соавт. [19] (адаптировано)
Table 3. The genotyping scheme proposed by N.J. Jensen *et al.* [19] (adapted)

Позиция в NC_001348.1 Position in NC_001348.1	33725	37902	38055	52365	69424	98437	114639
ORF	21	22	22	29	38	55	67
Клада 1 | Clade 1	**T**	A	T	C	G	**T**	T
Клада 2 | Clade 2	C	**G**	**C**	C	G	C	T
Клада 3 | Clade 3	C	A	T	C	**A**	**T**	T
Клада 4 | Clade 4	C	A	**C**	**T**	G	C	T
Клада 5 | Clade 5	C	A	T	**T**	G	**T**	T
Клада 6 | Clade 6	C	A	T	C	**A**	C	**C**
Клада VIII | Clade VIII	C	A	T	C	G	C	T
Клада 9 | Clade 9	C	A	**C**	C	**A**	C	T

Примечание. Чёрным выделены наименее распространённые «дискриминирующие» варианты.
Note. The least common “discriminatory” variants are highlighted in black.

последовательности сегментов открытых рамок считывания были отсеквенированы на приборе «Illumina MiSeq», при этом среднее покрытие составило приблизительно 10^4. Минимальное покрытие для каждого сегмента было около 300 прочтений. Консенсусные последовательности получали путём обработки «сырых» данных секвенирования с использованием ранее описанных общедоступных биоинформатических инструментов и собственного скрипта. Собранные консенсусные последовательности использовали в качестве входных данных для разработанного алгоритма, осуществляющего генотипирование VZV на основе дискриминирующих мутаций. Применяя данный алгоритм генотипирования, мы установили, что 17 образцов (22,67% от общего числа анализируемых последовательностей) приходились на кладу 1, 42 образца (56%) — на кладу 3 (**рисунок**), 13 (17,33%) образцов принадлежали к кладе 5. Помимо этого, среди всех секвенированных образцов нами выявлены единичные случаи инфекций, вызванных вирусами клад 2 (1,4%), 4 (1,4%) и 9 (1,4%) VZV (рисунок).



Представленность различных клад VZV в отдельных регионах РФ.

Representation of various clades of VZV in the Russian Federation

Обсуждение

В ходе данного исследования нами была разработана и оптимизирована методика быстрого типирования большого количества образцов VZV. Более того, используя описанный протокол генотипирования, мы получили первичные данные по кладам VZV, которые получили распространение на территории Москвы, Московской области и Ставропольского края. С использованием технологий секвенирования следующего поколения мы установили, что в рассматриваемых регионах получили распространение преимущественно вирусы, принадлежащие к кладам 1, 3 и 5. Также нами были обнаружены единичные образцы, относящиеся к кладе 2, кладе 4 и кладе 9, которые на фоне остальных клад являются минорной частью циркулирующих в этих областях РФ VZV. Стоит уточнить, что полученная картина распределения клад является наиболее правдоподобной для Москвы, так как наибольшее количество клинических образцов было получено именно из этого региона РФ. В дальнейшем, при наличии соответствующей возможности, планируется как увеличить общее количество образцов из регионов, рассматриваемых в данной работе, так и включить в исследование другие регионы России.

На текущий момент данные, полученные в результате нашего исследования, лишь позволяют предположить о во многом схожей картине распределения представителей VZV в исследуемых регионах РФ и в странах Европы [20], а также соответствуют ранее приведенным данным о циркулирующих кладах VZV в регионе Китая, граничащем с Россией [21]. Однако в исследуемых регионах, по-видимому, значительно бóльшую долю занимают вирусы, принадлежащие к кладе 3, кроме этого, процент представленности вирусов клады 5 в данных областях РФ также более высокий, нежели в европейских странах.

Заключение

VZV, этиологический агент ВО и опоясывающего герпеса, подразделяется на несколько ветвей, характеризующихся различными генетическими свойствами. Мы успешно использовали метод секвенирования следующего поколения для генотипирования VZV, что включает специальную панель праймеров и алгоритм генотипирования — подход, позволяющий ускорить процесс сбора данных и снизить затраты на подготовку образцов, особенно при увеличении количества образцов в одном цикле секвенирования. Используя эту методологию, мы установили, что в Москве, Московской области и Ставропольском крае преобладают клады 1, 3 и 5 VZV. Идентификация этих клад VZV предоставляет ценные эпидемиологические данные, полезные для формирования стратегий общественного здравоохранения, и приоткрывает завесу над распространённостью клад VZV в некоторых регионах РФ.

Отметим, что настоящее исследование является «пилотным» и по большей части носит методологический характер. Стоит также упомянуть, что в данной работе нами продемонстрирована распространённость клад VZV только для 3 из множества регионов РФ, таким образом, вопрос о глобальной

представленности различных клад вируса в нашей стране остаётся открытым и поэтому следует продолжить, а также расширить будущие исследования в целях формирования достоверной картины распределения клад VZV на территории России.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Laing K.J., Ouwendijk W.J.D., Koelle D.M., Verjans G.M.G.M. Immunobiology of varicella-zoster virus infection. *J. Infect. Dis.* 2018;218(Suppl. 2):S68–74. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiy403
2. Gershon A.A., Breuer J., Cohen J.I., et al. Varicella zoster virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015;1:15016. DOI: https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.16
3. Schmid D.S., Jumaan A.O. Impact of varicella vaccine on varicella-zoster virus dynamics. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(1):202–17. DOI: https://doi.org/10.1128/cmr.00031-09
4. Schmidt-Chanasit J., Sauerbrei A. Evolution and world-wide distribution of varicella-zoster virus clades. *Infect. Genet. Evol.* 2011;11(1):1–10. DOI: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.08.014
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.J.D. Molecular aspects of varicella-zoster virus latency. *Viruses.* 2018;10(7):349. DOI: https://doi.org/10.3390/v10070349
6. LaRussa P., Lungu O., Hardy I., et al. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products from vaccine and wild-type varicella-zoster virus isolates. *J. Virol.* 1992;66(2):1016–20. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.1016-1020.1992
7. Loparev V.N., Argaw T., Krause P.R., et al. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(9):3156–60. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3156-3160.2000
8. Quinlivan M., Hawrami K., Barrett-Muir W., et al. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J. Infect. Dis.* 2002;186(7):888–94. DOI: https://doi.org/10.1086/344228
9. Barrett-Muir W., Scott F.T., Aaby P., et al. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J. Med. Virol.* 2003;70(Suppl. 1):S42–7. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.10319
10. Muir W.B., Nichols R., Breuer J. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. *J. Virol.* 2002;76(4):1971–9. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.76.4.1971-1979.2002
11. Faga B., Maury W., Bruckner D.A., Grose C. Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome. *Virology.* 2001;280(1):1–6. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.2000.0775
12. Wagenaar T.R., Chow V.T., Buranathai C., et al. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. *Vaccine.* 2003;21(11-12):1072–81. DOI: https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00559-5
13. Loparev V.N., Gonzalez A., Deleon-Carnes M., et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.* 2004;78(15):8349–58. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8349-8358.2004
14. Loparev V., Martro E., Rubtcova E., et al. Toward universal varicella-zoster virus (VZV) genotyping: diversity of VZV strains from France and Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(2):559–63. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.01738-06
15. Sergeev N., Rubtcova E., Chizikov V., et al. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J. Virol. Methods.* 2006;136(1-2):8–16. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.021
16. Breuer J., Grose C., Norberg P., et al. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008. *J. Gen. Virol.* 2010;91(Pt. 4):821–8. DOI: https://doi.org/10.1099/vir.0.017814-0
17. Zell R., Taudien S., Pfaff F., et al. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J. Virol.* 2012;86(3):1608–22. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.06233-11
18. Norberg P., Depledge D.P., Kundu S., et al. Recombination of globally circulating varicella-zoster virus. *J. Virol.* 2015; 89(14):7133–46. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.00437-15
19. Jensen N.J., Rivailler P., Tseng H.F., et al. Revisiting the genotyping scheme for varicella-zoster viruses based on whole-genome comparisons. *J. Gen. Virol.* 2017;98(6):1434–8. DOI: https://doi.org/10.1099/jgv.0.000772
20. Pontremoli C., Forni D., Clerici M., et al. Possible European origin of circulating varicella zoster virus strains. *J. Infect. Dis.* 2020;221(8):1286–94. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiz227
21. Xu S., Chen M., Zheng H., et al. Nationwide distribution of varicella-zoster virus clades in China. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16(1):542. DOI: https://doi.org/10.1186/s12879-016-1863-x
22. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884–90. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14): 1754–60. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324
24. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16): 2078–9. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352
25. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic. Acids Res.* 2002;30(14):3059–66. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Информация об авторах

Надтока Максим Игоревич✉ — м.н.с. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, maximnadtoka@gmail.com, https://orcid.org/0009-0002-3217-0963

Лысенков Владислав Геннадиевич — биоинформатик лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-1468-1631

Аглетдинов Матвей Рашидович — биоинформатик лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0003-2249-7196

Information about the authors

Maksim I. Nadtoka✉ — junior researcher, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, maximnadtoka@gmail.com, https://orcid.org/0009-0002-3217-0963

Vladislav G. Lysenkov — bioinformatician, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-1468-1631

Matvei R. Agletdinov — bioinformatician, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0003-2249-7196

Мишкин Андрей Альбертович — м.н.с. ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0001-6911-6296

Афонина Наталия Михайловна — к.м.н., н.с. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-3205-4025

Плоскирева Антонина Александровна — д.м.н., зам. директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по клинической работе, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-3612-1889

Михеева Ирина Викторовна — д.м.н., профессор, зав. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0001-8736-4007

Хафизов Камиль Фаридович — к.б.н., зав. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0001-5524-0296

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0003-4228-9044

Участие авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 26.07.2023;
принята к публикации 20.10.2023;
опубликована 28.10.2023

Andrey A. Mishkin — junior researcher, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0001-6911-6296

Natalia M. Afonina — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory for immunological prophylaxis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-3205-4025

Antonina A. Ploskireva — D. Sci. (Med.), Deputy director for clinical work, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-3612-1889

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory for immunological prophylaxis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0001-8736-4007

Kamil F. Khafizov — PhD, Head, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0001-5524-0296

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director,Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0003-4228-9044

Author contribution. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 26.07.2023;
accepted for publication 20.10.2023;
published 28.10.2023