

*на правах рукописи*

ТЮМЕНЦЕВ АЛЕКСАНДР ИГОРЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
БОКАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В НОВОСИБИРСКЕ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2015

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ)

**Научный руководитель:**

д.б.н., доцент **Тикунова Нина Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

**Кочнева Галина Вадимовна**, д.б.н.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, зав. лабораторией

**Краснова Елена Игоревна**, д.м.н., профессор

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, зав. кафедрой

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в «\_\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В. В

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Бокавирус человека (НВoV), семейство *Parvoviridae*, был открыт в 2005 году в Швеции в носоглоточных смывах, полученных от детей с острыми респираторными заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей [Allander et al., 2005]. Это небольшой (18-26 нм) вирус, геном которого представлен одноцепочечной (+)ДНК [Gurda et al., 2010; Schildgen et al., 2013]. В 2007 г. НВoV был обнаружен и в образцах фекалий детей с гастроэнтеритами [Lee et al., 2007; Vicente et al., 2007; Albuquerque et al., 2007; Lau et al., 2007; Chieochansin et al., 2008]. В 2009-2010 гг. в образцах фекалий были обнаружены генетически отличающиеся варианты НВoV, названные НВoV2, НВoV3 и НВoV4, а открытый ранее вирус стали обозначать НВoV1 [Arthur et al., 2009; Kapoor et al., 2009; Kapoor et al., 2010]. В 2014 г. была предложена новая таксономия семейства *Parvoviridae*, согласно которой НВoV1-НВoV4 наряду с *gorilla bocavirus* входят в род *Bocaparvovirus*, в котором НВoV1 и НВoV3 принадлежат к одному виду, а НВoV2 и НВoV4 – к другому [Cotmore et al., 2014].

В связи с тем, что НВoV3 и НВoV4 встречаются значительно реже, чем НВoV1 и НВoV2, особенности структуры геномов этих вирусов исследованы недостаточно. Так, к моменту настоящего исследования в международной базе данных GenBank было представлено 7 геномов НВoV3 и лишь 1 полногеномная последовательность НВoV4. Кроме того, до сих пор нет единого мнения о происхождении НВoV и его генетических вариантов, мало изучены особенности молекулярной эволюции этого вируса. Не все известно об особенностях жизненного цикла НВoV, механизмах репликации его генома, что связано с отсутствием воспроизводимой системы культивирования НВoV и животных моделей заболеваний, вызываемых этим вирусом.

Молекулярно-эпидемиологические исследования НВoV интенсивно проводятся во многих странах. Накопленные клинические данные показали, что НВoV1 является возбудителем заболеваний дыхательных путей, хотя он обнаруживается и в образцах фекалий больных гастроэнтеритом [Jartti et al., 2011]. НВoV2, НВoV3 и НВoV4 в основном выявляются в образцах фекалий [Jartti et al., 2011], но также могут выявляться и в носоглоточных смывах. Несмотря на множество проведенных исследований, до сих пор нет единого мнения об этиологической роли НВoV, в частности НВoV2, НВoV3 и НВoV4, в гастроэнтеритах. Разная встречаемость НВoV в различных регионах и частое выявление НВoV одновременно с другими вирусами, вызывающими острые кишечные инфекции (ОКИ), не позволяют сделать однозначных выводов [Wang et al., 2011; Khamrin et al., 2012].

В Российской Федерации до начала наших исследований встречаемость и генетическое разнообразие НВoV, ассоциированных с гастроэнтеритами, детально не изучали, поэтому не был известен вклад НВoV в этиологию этих заболеваний,

отсутствовали данные об эпидемиологических особенностях инфекций, вызываемых НВовV, не были известны сведения о генетическом разнообразии штаммов, циркулирующих на территории РФ, в международной базе данных GenBank не были представлены геномные последовательности изолятов НВовV, выявленных в РФ.

Исходя из вышесказанного, **целью** настоящей диссертационной работы являлось изучение встречаемости и генетического разнообразия изолятов НВовV у детей, госпитализированных с гастроэнтеритами, а также исследование особенностей молекулярной эволюции и репликации этого вируса. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1) оценить встречаемость ДНК НВовV в образцах фекалий детей раннего возраста, госпитализированных с гастроэнтеритами в 2010-2012 гг. в Новосибирске, и у здоровых детей;

2) генотипировать выявленные изоляты НВовV и провести филогенетический анализ полученных данных, в частности проанализировать эпидемиологические особенности инфекций, вызываемых НВовV1 и НВовV2;

3) определить полногеномные последовательности новосибирских изолятов НВовV, принадлежащих к различным генотипам;

4) исследовать особенности молекулярной эволюции НВовV;

5) исследовать особенности репликации НВовV.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые в Российской Федерации исследована встречаемость НВовV у детей раннего возраста, госпитализированных с гастроэнтеритами, и здоровых детей и показано, что вклад этого вируса в этиологию этих заболеваний невысок. Впервые изучено генетическое разнообразие циркулирующих в Российской Федерации штаммов НВовV. Определены полногеномные последовательности новосибирских изолятов НВовV, принадлежащих к различным генотипам, в том числе и редко встречающихся НВовV4 и рекомбинантного НВовV3/НВовV4. Исследованы особенности молекулярной эволюции НВовV, и впервые установлено, что скорость накопления мутаций в геноме НВовV составляет  $8.6 \times 10^{-4}$  замен/сайт/год, являясь высокой для вирусов с ДНК-геномом. Впервые проведена датировка формирования современных генетических вариантов НВовV.

**Практическая значимость работы.** Проводившееся оперативное выявление этиологической причины ОКИ у детей раннего возраста, госпитализированных в специализированную клинику, позволило врачам этой клиники оптимизировать курс лечения.

Результаты проведенного исследования позволили определить этиологическую причину в случаях, ранее относившихся к кишечным инфекциям неустановленной этиологии. Полученные данные включены в статистические отчеты детской городской клинической больницы №3 и вошли в Государственные доклады о санитарно-эпидемиологической обстановке на территории Новосибирской области.

Многолетний мониторинг генетического спектра циркулирующих бокавирусов является актуальным ввиду социальной значимости острых кишечных инфекций, а

исследование изменчивости геномов этого патогена важно для прогнозирования появления новых эпидемически значимых вариантов бокавируса.

Результаты проведенных исследований будут использованы для подготовки практических рекомендаций для клиницистов, специалистов СЭС и эпидемиологов по контролю и профилактике вирусных кишечных инфекций и внедрению современных методов диагностики.

В рамках работы были получены 62 последовательности участка гена, кодирующего неструктурный белок (NS1), длиной 495 н.о. Определены полные нуклеотидные последовательности, за исключением 5'- и 3'- нетранслируемых областей, 6 изолятов НВoV, из которых три изолята являются редко встречающимися. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международной базе данных GenBank NCBI и являются важным дополнением к существующим в этой базе последовательностям, что может способствовать изучению роли НВoV в ОКИ у детей раннего возраста.

**Апробация работы и публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, цитируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Материалы диссертации были представлены на Российских конференциях с международным участием: VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА - 2010» (Москва, Россия, 2010); XLIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2011); Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, Россия, 2013); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2014» (Новосибирск, Россия, 2014).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов работы, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы; содержит одно приложение. Работа изложена на 131 странице текста, содержит 30 рисунков и 6 таблиц. Список литературы состоит из 193 ссылок.

**Вклад автора.** Все эксперименты и анализ полученных данных сделаны лично автором, за исключением определения нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'- нетранслируемых областей, скорости молекулярной эволюции НВoV и рекомбинационных событий НВoV, которые проводились совместно с с.н.с. ЛММБ ИХБФМ СО РАН И.В. Бабкиным.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Исследование эпидемических особенностей бокавирусной инфекции человека в Новосибирске**

На первом этапе были изучены эпидемические особенности бокавирусной инфекции в Новосибирске. Для этого на наличие ДНК НВoV исследовали образцы фекалий, полученных от всех детей раннего возраста, госпитализированных с

диагнозом ОКИ в 3-е отделение МУЗ Детская городская клиническая больница №3 г. Новосибирска в 2010-2012 гг. Аналогично исследовали образцы фекалий от здоровых детей, проходивших диспансеризацию в ГБУЗ НСО Новосибирской районной больницы № 1 в 2012 г. На каждого ребенка, участвовавшего в исследовании, составлялась карта пациента, где указывались клинические и эпидемиологические данные. На основании этих карт данные переносились в специально разработанную базу данных на базе Microsoft Access.

Всего за исследуемый период было протестировано на наличие ДНК НВoV 5264 образца фекалий, полученных от детей с диагнозом ОКИ, и 339 образцов фекалий от здоровых доноров.

ДНК НВoV выявляли методом ПЦР, визуализацию продукта реакции проводили электрофоретически. ДНК НВoV была обнаружена в 62 пробах, полученных от детей с диагнозом ОКИ, что составило 1,2 % от общего числа образцов, и в одном образце от здоровых детей, что составило 0,3 %. Встречаемость ДНК НВoV отличалась в разные годы исследований (таблица 1): в 2010 г. она составила 1,2 % (19/1467), в 2011 г. -1,7 % (34/1980), а в 2012- 0,5 % (9/1817).

Все исследуемые образцы фекалий от больных с диагнозом ОКИ и от здоровых доноров были протестированы на наличие не только ДНК НВoV, но и на наличие РНК ротавирусов группы А (HRVA), норовирусов II геногруппы (HNoVII) и астровирусов человека (HAstV). Кроме того, все НВoV-положительные образцы были исследованы на наличие ДНК аденовирусов F и ДНК патогенных бактерий: сальмонелл, кампилобактерий, шигелл и энтероинвазивных *E. coli*. В связи с этим можно было оценить вклад НВoV в этиологию ОКИ в составе моноинфекций и инфекций сочетанной этиологии.

За весь исследуемый период ОКИ, вызванные моноинфекцией НВoV, были выявлены в 54,8 % образцов от всех обнаруженных случаев бокавирусной инфекции (таблица 1), однако этот показатель варьировал в разные годы. Так, в 2010 г. НВoV встречались в виде моноинфекций почти в 52,6 % случаев от обнаруженных за этот год (10/19), в 2011 г. произошло увеличение доли моноинфекций до 53,8 % (21/34), а в 2012 г. НВoV встречались в виде моноинфекций в приблизительно в половине

**Таблица 1.**  
Распределение НВoV, выявленных у детей с ОКИ в Новосибирске (февраль 2010- декабрь 2012)

Вирусы/Бактерии	Количество образцов				
	НВoV	НВoV1	НВoV2	НВoV3	НВoV4
НВoV <i>alone</i>	34	11	21	1	1
НВoV с др. агентами ОКИ	28	13	14	0	1
НВoV, HNoVGII	10	6	4	0	0
НВoV, HRVA	9	4	5	0	0
НВoV, <i>Shigella</i> spp. and EIEC	1	0	1	0	0
НВoV, <i>Campylobacter</i> spp.	3	2	1	0	0
НВoV, HRVA, HNoVGII	2	0	2	0	0
НВoV, HNoVGII, HAstV	1	0	1	0	0
НВoV, HRVA, <i>Campylobacter</i> spp.	1	1	0	0	0

HBoV, HNoVGII, <i>Shigella</i> spp. and EIEC	1	0	0	0	1
Всего	62	24	35	1	2

случаев (5/9). В HBoV-положительном образце от здорового ребенка нуклеиновых кислот других возможных возбудителей ОКИ обнаружено не было.

В 44,9 %, случаях HBoV были зарегистрированы при ОКИ сочетанной этиологии: в 32,2 % случаев они встречались в сочетании с одним инфекционным агентом, преимущественно с наиболее распространенными HNoVII и HRVA, в 13 % случаев - в сочетании более чем с одним патогеном. При этом более 10 % выявленных случаев бокавирусной инфекции были обнаружены в сочетании с бактериальными патогенами (таблица1).

Анализ сезонной встречаемости бокавирусов показал, что они выявлялись в течение всего периода исследования, кроме марта месяца. Выявляемость бокавирусов по отношению к общему числу поступивших с диагнозом ОКИ в различные месяцы варьировала от 0 % до 6,5 % (рисунок 1). Наибольшее число выявленных бокавирусов было обнаружено в феврале 2011 г., причем в этом месяце бокавирусы встречались чаще, чем астровирусы, которые являются третьей причиной ОКИ среди вирусных патогенов, уступая ротавирусам и норовирусам [Babkin et al., 2013]. Анализ помесечной динамики выявления показал, что HBoV преимущественно встречались в осенне-зимние месяцы: в октябре – ноябре и в январе – феврале (рисунок 1).

При анализе возрастного распределения больных с бокавирусной инфекцией за весь исследуемый период были выявлены следующие особенности. Чаще всего бокавирусы выявлялись у детей в возрасте от 6 до 8 месяцев, при этом 87 % (54/62) заболевших были младше одного года и более 96 % заболевших были младше полутора лет. В нашем исследовании не была обнаружена зависимость частоты выявления HBoV от пола ребенка.

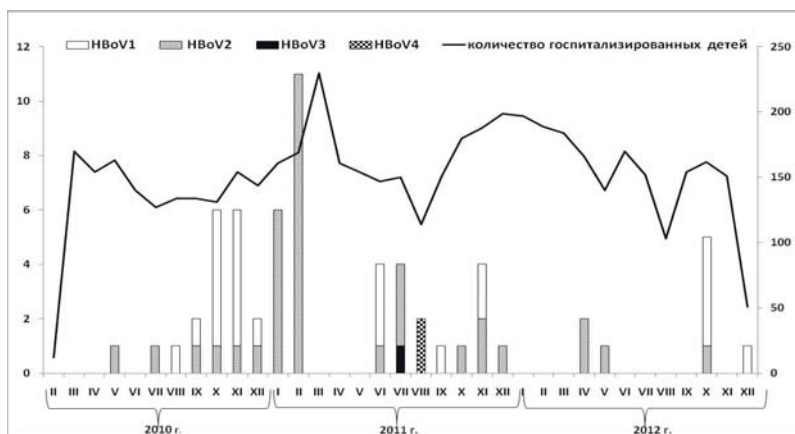


Рисунок 1. Сезонное распределение HBoV инфекции у детей с ОКИ

## 2. Генотипирование изолятов бокавирусов, выявленных в Новосибирске

Для определения генетического разнообразия НВoV, циркулирующих в Новосибирске, все ПЦР-фрагменты, обнаруженные при детекции НВoV, были секвенированы. Все секвенированные последовательности были депонированы в базе данных GenBank, номера доступа JX046072 - JX046105 и KJ492895 -KJ492923.

Филогенетический анализ определенных нуклеотидных последовательностей показал, что из описанных к настоящему времени четырех генетических вариантов НВoV в Новосибирске были обнаружены: НВoV1 – 24 изолята (38,7 %), НВoV2 – 36 изолятов (56,4 %), НВoV3 – один изолят (1,6 %) и НВoV4 – два изолята (3,2 %) (рисунок 2). Выявленная нуклеотидная последовательность в образце от здорового ребенка принадлежала к НВoV2 (рисунок 2).

Большинство последовательностей фрагмента ОПТ1 изолятов НВoV1, обнаруженных в 2010-2012 гг., были полностью идентичны между собой, а также изолятам, выявленным ранее в Нидерландах (2007), США (2009), Японии (2009) и Тунисе (2010). Только три последовательности фрагментов ОПТ1 изолятов N4932, N5042 и N5274, обнаруженных в октябре и декабре 2012 г., отличались от них на 1-2 н.о. (рисунок 2). Нуклеотидные последовательности фрагмента ОПТ1 изолятов НВoV2 разделились на две клады, соответствующие субгенотипам НВoV2А и НВoV2В (рисунок 2). В первой кладе, НВoV2А, находилось 7 последовательностей, четыре из которых (все обнаружены в 2010 г.) были идентичны последовательности изолята GQ281567, выделенного в Корее в 2009 г., а остальные группировались с последовательностями, выделенными в Китае (FJ911565, GU301645), Тайланде (GU048662) и Нигерии (FJ973560) в 2009 г. Во второй кладе, НВoV2В, находилось 29 последовательностей, 24 из которых, включая последовательность, полученную из образца от здорового ребенка, были идентичны соответствующим последовательностям из Тайланда (GU048663) [Chieochansin et al., 2010] и Ирана (JN091181) а также кластеризовались с изолятами из Великобритании (GU048664, FJ170280) [Chieochansin et al., 2010; Karoor et al., 2009] и Австралии (EU082213, EU082214) [Arthur et al., 2009].

Нуклеотидная последовательность фрагмента ОПТ1 НВoV3, обнаруженная в образце ребенка, госпитализированного в июле 2011 г., была полностью идентична соответствующим последовательностям изолятов НВoV3, выявленных в различных регионах мира в 2008-2011 гг. (рисунок 2). Две нуклеотидные последовательности фрагментов ОПТ1 НВoV4, обнаруженные нами в августе 2011г., различались на 5 н.о. между собой и отличались от ближайшей последовательности изолята НВoV4-NI-385-07 из Нигерии (FJ973561) на 14 и 9 н.о., а от последовательности тайландского изолята НВoV4-СМН-S011-11 (KC461233) на 26 и 21 н.о. соответственно (рисунок 2).

Таким образом, в Новосибирске за весь исследуемый период были обнаружены изоляты всех четырех генетических вариантов НВoV, описанных к настоящему времени, причем чаще всего выявлялись изоляты НВoV2, хотя встречаемость каждого генетического варианта в различные годы отличалась.



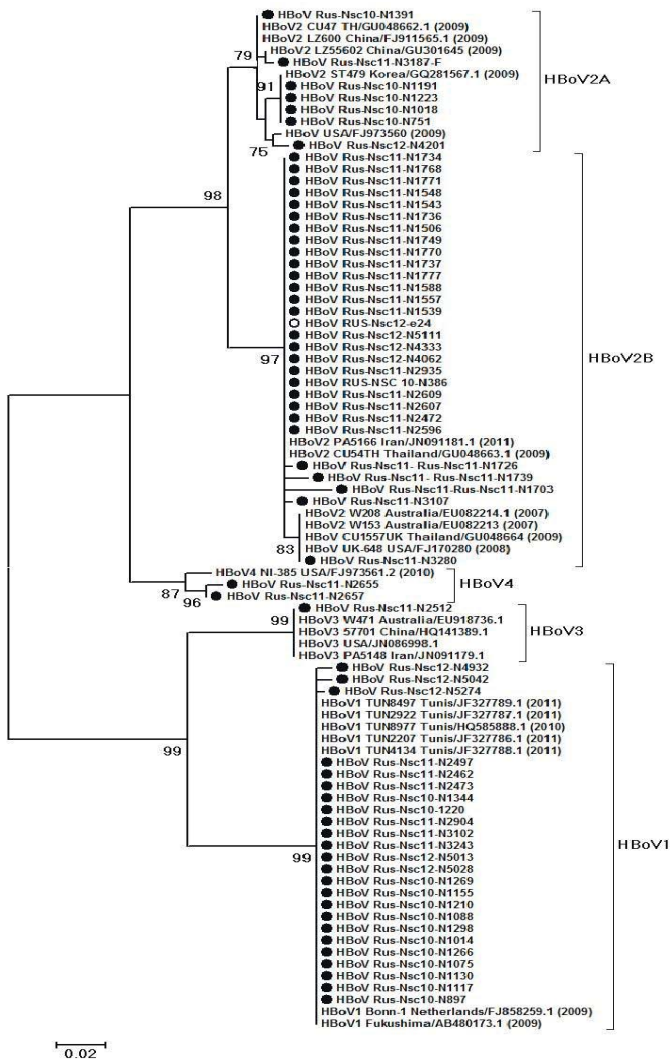


Рисунок 2. Филограмма нуклеотидных последовательностей фрагментовОРТ1 изолятов бокавирусов, построенная методом максимального правдоподобия, в узлах указаны статистические индексы поддержки. Черными кружками отмечены изоляты бокавирусов, выявленных в Новосибирске у детей с ОКИ, белым кружком отмечен бокавирус, выявленный у здорового ребенка в Новосибирске

Большинство изолятов НВoV1 были обнаружены в 2010 г. – 54 % (13/24), в 2011 г. было выявлено 6 изолятов НВoV1, в 2012 г. – 5 изолятов (рисунок 1). Анализ помесячной динамики выявления показал, что изоляты НВoV1 обнаруживались в образцах стула от детей, госпитализированных с ОКИ с июня по декабрь;

встречаемость НВов1 варьировала от 1 образца в сентябре 2011 г. до 5 образцов в октябре и ноябре 2010 г. Статистически значимые отличия были выявлены при сравнении встречаемости НВов1 в 2010 г. и 2011 г., в 2011 г. и 2012 г. ( $\chi^2=12,04$ ,  $p=0,05$  и  $\chi^2=4,58$ ,  $p=0,05$  соответственно).

Большинство изолятов НВов2 были выявлены в 2011 г. - 71,4 % (25/35), в 2010 г. было выявлено лишь 6 изолятов НВов2, в 2012 г. – еще 4 (рисунок 1). Изоляты НВов2 выявлялись круглогодично с увеличением частоты встречаемости в зимние месяцы: в январе – феврале. Статистически значимые отличия были обнаружены при сравнении данных встречаемости НВов2 в 2010 г. и 2011 г., в 2011 г. и 2012 г. ( $\chi^2=12,04$ ,  $p=0,05$  и  $\chi^2=4,58$ ,  $p=0,05$  соответственно). Изолят НВов2 от здорового ребенка был выявлен в феврале 2012 г.

Анализ зависимости возрастного распределения пациентов от генотипа НВов показал, что встречаемость НВов1 у детей первого года жизни составила 91,7 % (22/24), а встречаемость НВов2 – 83,8 % (30/35) (рисунок 3). Средний возраст пациентов с НВов1 в образцах составил 8,3 месяца, а с НВов2 – 8 месяцев. Не было статистически значимых отличий во встречаемости НВов1 и НВов2 у детей первого года жизни - 40,7 % (22/54) и 55,6 % (30/54), соответственно ( $\chi^2=2,37$ ,  $p=0,05$ ). Изоляты НВов3 и НВов4 были обнаружены у детей возраста 14 месяцев (НВов3) и 10 месяцев (оба изолята НВов4). В коллекции образцов от здоровых детей изолят НВов был обнаружен у ребенка возраста 2-х месяцев.

Мы сравнили встречаемость НВов1 и НВов2 в виде моноинфекций и инфекций сочетанной этиологии, статистически значимых отличий обнаружено не было ( $\chi^2=1,15$ ,  $p=0,05$ ). Из 35 образцов с НВов2 в 21 образце (60 %) присутствовала только ДНК НВов2; в 14 образцах (40 %) ДНК НВов2 выявлялась вместе с РНК и/или ДНК других вероятных возбудителей ОКИ, (в основном с РНК HRVA или HNoVGII), из которых в 3-х образцах ДНК НВов2 присутствовала совместно с нуклеиновыми кислотами двух и более вирусных и/или бактериальных агентов (таблица 2). Встречаемость НВов1 в виде моноинфекции составила 45,8 % (11/24); в 13 образцах (54,2 %) наряду с ДНК НВов1 присутствовали нуклеиновые кислоты других энтеропатогенных вирусов или бактерий, в основном HRVA или HNoVGII.

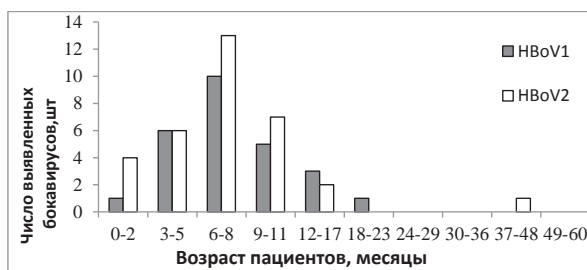


Рисунок 3. Возрастное распределение (среди положительных образцов на НВов) у детей с ОКИ

### 3. Секвенирование геномов изолятов бокавирусов, выявленных в Новосибирске

Всего к началу данного исследования в международной базе данных GenBank было зарегистрировано 134 полных нуклеотидных последовательностей геномов НВoV. Из них 117 – это последовательности изолятов НВoV1, 9 – изолятов НВoV2, 7 - изолятов НВoV3 и одна последовательность изолята НВoV4. Мы определили геномные последовательности новосибирских изолятов НВoV, принадлежащих ко всем известным генетическим вариантам, и провели сравнительный анализ этих последовательностей с известными.

В ходе работы были определены полные нуклеотидные последовательности изолята НВoV1 RUS-NSC10-N1117 выявленного в Новосибирске в октябре 2010 г., изолятов НВoV2 RUS-NSC10-N386 и RUS-NSC10-N751, выявленных в мае и июле 2010 г., изолята НВoV3 RUS-NSC11-N2512, выявленного в Новосибирске в июле 2011 г., и изолятов НВoV4 RUS-NSC11-N2655 и RUS-NSC11-N2657, выявленных в Новосибирске в августе 2011 г. Нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных GenBank под номерами JQ964114, JQ964116, JQ964115, KJ710645, KJ649741 и KJ649742 соответственно.

Для определения нуклеотидной последовательности изолятов НВoV, был разработан набор из 31 оригинального праймера. Кроме того, использовали два ранее описанных праймера: НВoVsf2 и НВoVsr2 [Капоор et al., 2009].

Шесть определенных и 25 референсных (как наиболее близкие к полученным последовательностям, так и наиболее от них отдаленные) нуклеотидных последовательностей были выровнены в программе Clustal. Созданное выравнивание было вручную верифицировано. Затем был выполнен филогенетический анализ данных методами максимального правдоподобия (рисунок 4).

Из филогенетического дерева (рисунок 4) следует, что нуклеотидная последовательность новосибирского изолята НВoV1 кластеризуется с изолятами НК10 (EF450726) и TUN2207 (JF327786), выделенными соответственно в 2005 г. в Гонконге и в 2010 г. в Тунисе. Новосибирские изоляты НВoV2 группируются со штаммами W298 (FJ948860) и W208 (EU082214), выделенными в 2001 г. в Австралии [Arthur et al., 2009]. Филогенетический анализ полногеномной последовательности изолята НВoV3 подтвердил ее принадлежность к НВoV3, однако эта последовательность находится на отдельной ветке. Наиболее близкой к геномной последовательности новосибирских изолятов НВoV4 является геномная последовательность НВoV4-NI-385 (FJ973561), выделенная в 2007 г. в Нигерии.

Анализ попарной изменчивости нуклеотидных последовательностей изолятов НВoV, выявленных в Новосибирске, относительно наиболее гомологичных последовательностей НВoV соответствующих генотипов показал, что наиболее консервативной была геномная последовательность изолята НВoV1 RUS-NSC10-N1117, а наименее консервативными – геномные последовательности изолятов НВoV3 и НВoV4, выявленных в Новосибирске (таблица 2). Из всех ОПТ наименьшая

изменчивость была выявлена у OPT1, кодирующей неструктурный белок NS1 (таблица 2).



Рисунок 4. Филограмма полногеномных последовательностей (не включающих нетранслируемые 5'- и 3'-области) изолятов бокавирусов, построенная методом максимального правдоподобия, в узлах указаны статистические индексы поддержки. Черными кружками отмечены изоляты бокавирусов, выявленных в Новосибирске

Таблица 2.

Показатели попарной изменчивости нуклеотидных последовательностей изолятов HBoV, выявленных в Новосибирске, относительно наиболее гомологичных последовательностей HBoV соответствующих генотипов

Изолят	OPT1	OPT2	OPT3	Вся послед-ть
Сравнение с HBoV1 (JF327786)				
HBoV1_RUS-NSC10-N1117	$0,05 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,75 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,05 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,17 \times 10^{-2}$ замен/сайт
Сравнение с HBoV2 (EU082214)				
HBoV2_RUS-NSC10-N386	$0,36 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,31 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,55 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,47 \times 10^{-2}$ замен/сайт
HBoV2_RUS-NSC10-N751	$0,26 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,77 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,60 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,51 \times 10^{-2}$ замен/сайт
Сравнение с HBoV3 W471 (EU918736)				
HBoV3_RUS-NSC11-N2512	$0,52 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$0,46 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$9,76 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$4,32 \times 10^{-2}$ замен/сайт
Сравнение с HBoV4 NI385 (FJ973561)				
HBoV3_RUS-NSC11-N2512			$5,94 \times 10^{-2}$ замен/сайт	
HBoV4_RUS-NSC11-N2655	$2,03 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$2,44 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$2,97 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$2,68 \times 10^{-2}$ замен/сайт
HBoV4_RUS-NSC11-N2657	$2,14 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$2,28 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$4,31 \times 10^{-2}$ замен/сайт	$3,46 \times 10^{-2}$ замен/сайт

#### 4. Анализ рекомбинационных событий в геномах НВов

При построении деревьев на основе аминокислотных последовательностей вирусных белков изучаемых изолятов НВов были отмечены отличия в топологии деревьев, построенных для разных ОРТ в случае изолятов НВов2 и НВов3 (рисунок 5), что можно объяснить их происхождением в результате рекомбинации [Fu et al., 2011; Kapoor et al., 2009; 2010; Cheng et al., 2011; Babkin et al., 2013].

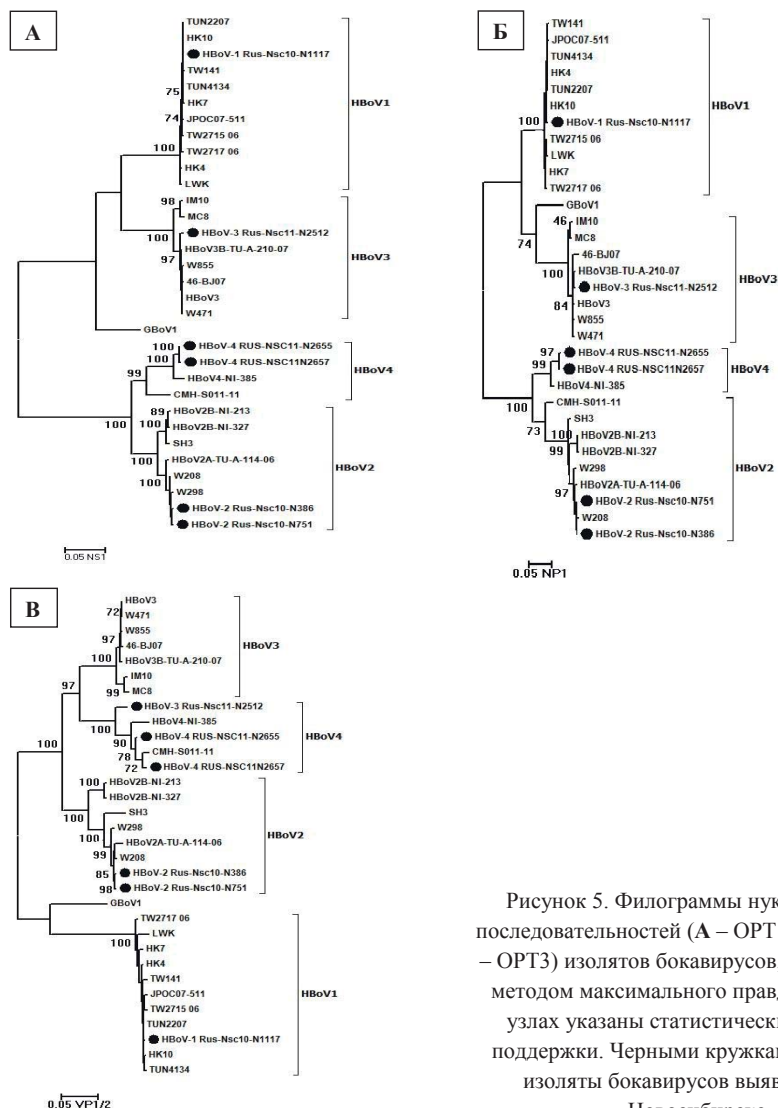


Рисунок 5. Филограммы нуклеотидных последовательностей (А – ОРТ1, Б – ОРТ2, В – ОРТ3) изолятов бокавирусов, построенные методом максимального правдоподобия, в узлах указаны статистические индексы поддержки. Черными кружками отмечены изоляты бокавирусов выявленных в Новосибирске

Так, хотя филогенетический анализ полногеномной последовательности подтвердил принадлежность новосибирского изолята RUS-NSC11-N2512 к HBoV3 (рисунок 5), при филогенетическом анализе отдельных OPT наблюдалась сложная картина. На деревьях, построенных на основе OPT1 и OPT2, этот изолят показывал значительное сходство с шестью близкородственными штаммами генотипа HBoV3, в то время как при анализе OPT3 он с высокой достоверностью кластеризовался с изолятами HBoV4 (рисунок 5). Для OPT1 уровень идентичности изолята RUS-NSC11-N2512 с изолятом TU-A-210-07 HBoV3 составил 99,5 %, с остальными пятью изолятами кластера – 99,3 %-99,4 %. Для OPT2 значения идентичности составили 99,6 % между изучаемым новосибирским изолятом и TU-A-210-07, и 99,5 % в случае остальных пяти изолятов. Уровень идентичности OPT3 между изолятами HBoV3 RUS-NSC11-N2512 и TU-A-210-07 HBoV3 составил всего 89,9 %, а наибольшее сходство изучаемого изолята наблюдалось с изолятом HBoV-4 CMH-S011-11 – 96,4 %. Этот факт свидетельствует о рекомбинационном происхождении изолята HBoV3 RUS-NSC11-N2512.

Для исследования рекомбинационных событий в геномах новосибирских изолятов был проведен анализ их геномных последовательностей в пакете программ RDP, при использовании различных методов - RDP, GeneConv, BootScan, SiScan и др. Анализ не выявил значимых рекомбинационных событий в геномах новосибирских изолятов HBoV4. Отдельные методы показывали возможность рекомбинации в этих изолятах, но надежность этих событий была невысока и не поддерживалась анализом, проведенным другими методами.

Проведенный анализ точек рекомбинации в геноме изолята HBoV3 RUS-NSC11-N2512 в пакете программ RDP при использовании метода BootScan с высокой надежностью выявил существование сайта рекомбинации в районе 3270 н.о. в геноме этого изолята. Этот район имеет координаты 3250-3290 н.о. при отсечении 70 % и расположен в начале гена, кодирующего белок VP1. Проведенное исследование выявило еще один небольшой район 4150-4260 н.о. в центральной части гена, кодирующего белок VP1, имеющий значимое сходство с геномом HBoV3 (рисунок 6).

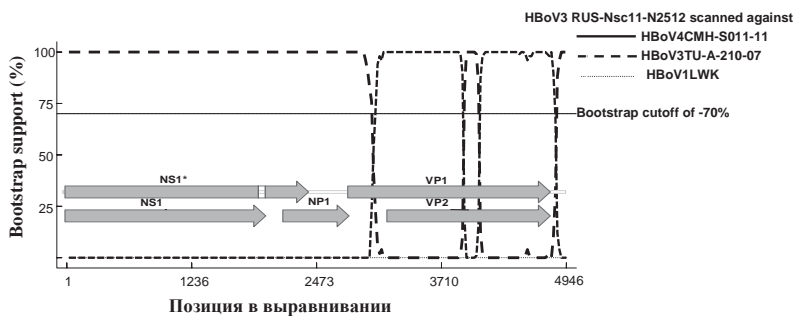


Рисунок 6. Bootscan анализ генома изолята RUS-NSC11-N2512 с референсными изолятами HBoV генотипов 1, 2 и 3. Серые стрелки показывают OPT HBoV

## 5. Оценка скорости молекулярной эволюции НВoV

Для дальнейшего анализа кроме полных геномных последовательностей шести изолятов НВoV, выделенных в Новосибирске, также использовали полные геномные последовательности девяти штаммов НВoV разных генотипов с известными данными о времени их изоляции. В анализ не вошли последовательности штаммов, точное время изоляции которых не известно. Кроме того, из анализа были исключены последовательности изолятов НВoV2 и НВoV3, поскольку при формировании этих генотипов важную роль играли рекомбинационные процессы. Таким образом, эволюционную историю бокавирусов реконструировали на основе последовательностей НВoV1, НВoV4 и GBoV1.

Вначале полные геномные последовательности этих бокавирусов были проверены на наличие сайтов рекомбинации в пакете программ RDP3, при этом вероятность потенциальных рекомбинационных событий оказалась низкой. Средние значения отношения несинонимичных замен к синонимичным ( $dN/dS$ ,  $\omega$ ) составили 0.14 в случае OPT1, 0.33 - для OPT2 и 0.13 - для OPT3. Анализ выявил, что все гены находятся под действием консервативной селекции, так как во всех случаях  $\omega < 1$ . Более того, методы SLAC и PARRIS, использованные для обнаружения посайтового селективного давления, не выявили позитивной селекции ( $p < 0.1$ ). Полученные результаты свидетельствуют о возможности проведения эволюционного анализа на основе данных последовательностей.

Реконструкция молекулярной эволюции осуществлялась с использованием программы Beast на основе известных дат изоляции штаммов бокавирусов. В качестве начальной была использована скорость эволюции данных вирусов  $8.6 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год (95 % HPD:  $3.5-15.0 \times 10^{-4}$ ), ранее установленная в работе Zehender и др. [Zehender et al., 2010] на основе фрагмента OPT3. На первом этапе была оценена приемлемость гипотезы строгих молекулярных часов для проводимого эволюционного анализа бокавирусов с помощью теста отношения правдоподобия [Huelsenbeck and Rannala, 1997]. На его основе был сделан вывод о необходимости использования релаксированных лог-нормальных часов для датирования молекулярной эволюции бокавирусов. Поэтому для анализа была использована НКУ+Г модель эволюции, предварительно выбранная в программе Modeltest 3.7. Известно, что эта модель наиболее четко описывает изменчивость в кодирующих последовательностях геномов [Shapiro et al., 2006].

При анализе хронограммы, основанной на полногеномных нуклеотидных последовательностях бокавирусов (рисунок 7), можно заключить, что НВoV4 отделился от НВoV1 около 200 лет назад, а GBoV1, изолированный от гориллы, содержащейся в неволе в США, дивергировал от НВoV1 позднее. К сожалению, надежность положения ветви GBoV1 весьма низка (апостериорная вероятность около 60 %) в отличие от остальных узлов, для которых значения апостериорной вероятности более 95 %. При анализе скоростей эволюции можно отметить, что для разных ветвей она варьирует в пределах одного порядка величины и составляет от  $1.6 \times 10^{-4}$  до  $1.6 \times 10^{-3}$  замен на сайт в год. Эти величины соответствуют скоростям

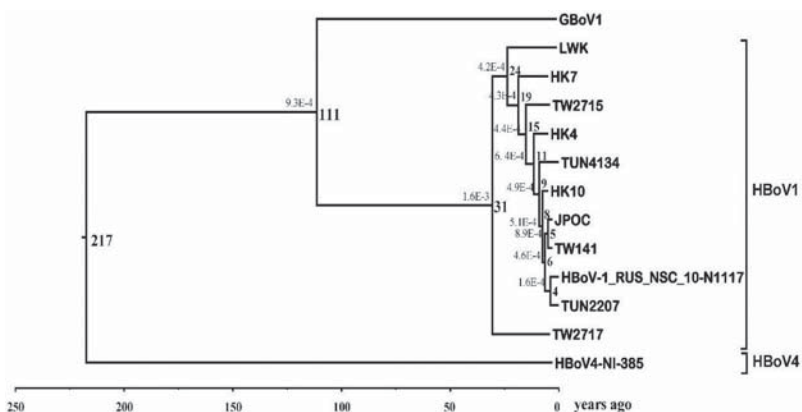


Рисунок 7. Хронограмма, построенная на основе нуклеотидных последовательностей полных геномов различных генотипов HBoV (обозначения штаммов приведены в таблице 4). Времена дивергенции оценены с использованием программы Beast. Значения времен дивергенции в годах приведены в узлах дерева

накопления мутаций, ранее полученным в работе Zehender и др. [Zehender et al., 2010].

В работе [Sharpetal., 2010] авторы выявили бокавирусы в образцах фекалий диких горилл и шимпанзе из Камеруна в 2009 году. Были получены данные о нуклеотидной структуре "бокавирус-подобных" вирусов: четырех фрагментов OPT1 (два от горилл – GG-GB2155, GG-CP1426 и два от шимпанзе – PT-BQ2392, PT-LM1861) и трех фрагментов OPT3 (для тех же изолятов, за исключением изолята GG-GB2155). Эти последовательности также были использованы в эволюционном исследовании HBoV. С учетом этих последовательностей, последовательностей всех генотипов HBoV и бокавируса гориллы GBoV1 [Кароог et al., 2010b] были построены выравнивания для изучаемых фрагментов OPT1 и OPT3. Отсутствие достоверных сайтов рекомбинации в изучаемых геномных фрагментах позволили провести реконструкцию эволюционной истории бокавирусов. Для этого были построены хронограммы с использованием описанных выше подходов. Были использованы релаксированные лог-нормальные молекулярные часы и установлено, что средняя скорость эволюции для обоих деревьев составила около  $9 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год.

Интересно, что все последовательности изолятов бокавируса гориллы из США и из Камеруна показывают высокую гомологию между собой и образуют общую кладу с HBoV1 на обоих деревьях. В то же время изоляты бокавируса шимпанзе значительно отличаются друг от друга. Таким образом, анализируя времена дивергенции предков современных генотипов бокавирусов приматов, можно отметить, что времена дивергенции HBoV1 и HBoV4, а также изолятов бокавируса горилл и HBoV1 от общих предков хорошо согласуются между собой на обеих полученных хронограммах.



## 6. Исследование особенностей репликации НВoV

Ранее при изучении особенностей репликации НВoV были обнаружены структуры интермедиатов типа «голова к хвосту» у НВoV1, НВoV2, и НВoV3, porcine bocaviruses и canine bocavirus, при этом структуры типа «голова к голове» или «хвост к хвосту» у этих вирусов обнаружены не были, что могло свидетельствовать о механизме репликации бокавирусов, отличающимся от других парвовирусов [Cheung et al., 2010; Karoog et al., 2011; Lüsebrink et al., 2011; Zhao et al., 2012; Huang et al., 2012]. Для изучения возможных механизмов репликации бокавирусов, включая НВoV4, репликационные интермедиаты которого не исследовались, мы попытались получить репликативные интермедиаты НВoV4 и других НВoV.

Для секвенирования концевых районов новосибирских изолятов НВoV4 и обнаружения возможных конкатомерных и эписомальных форм геномов вирусов мы использовали набор праймеров, рассчитанный на основе последовательностей новосибирских изолятов НВoV4 (таблица 3) и консервативный для всех генотипов НВoV. Прямые праймеры были рассчитаны на основе 3'-конца НВoV4, а обратные – 5'-концевой последовательности генома. Цифры в названии праймера соответствуют шагам гнездового ПЦР.

**Таблица 3.**

Праймеры, используемые для обнаружения предполагаемых промежуточных структур

Праймеры	Последовательности (5'–3')
Первый раунд гнездовой ПЦР	
F1+	GGGTGACTGTAATCCCGAGCTCAT
F1-	ACGAATATTCAAGGAGAGGTTACCTGTT
R1+	AGTCTGACGAGATGCGGAAGTGC
R1-	GGTCTCTACAAGTGAGCGGCCTCT
Второй раунд гнездовой ПЦР	
F2+	GTGTTGCCGTCTCGAACCTAGC
F2-	TCCGATGTCAGGCTACCGTCAAC
R2+	TACGTCACCTCCTGGGCGTGTT
R2-	ATATATCCGATATACGAGTTACGACTAACC

«+» - прямой праймер; «-» - обратный праймер; «F» - последовательность праймера, соответствующая ориентации «голова»;

«R» - последовательность праймера, соответствующая ориентации «хвост»

Праймеры были проверены во всех возможных сочетаниях «голова»/«хвост» методом гнездовой ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК изолятов НВoV4 RUS-NSC11-N2655 и RUS-NSC11-N2657. В результате было показано, что ПЦР-продукт нарабатывается только при использовании праймеров F+/R+ («голова»/«хвост») на матрице RUS-NSC11-N2657, что соответствует кольцевой последовательности отрицательной полярности в ориентации «голова к хвосту» (рисунок 8). Все минорные фрагменты, полученные в ходе ПЦР, также были секвенированы. Обнаружено, что они образуются вследствие ошибочного праймирования и не содержат концевых последовательностей генома НВoV.

Дополнительно аналогично были проанализированы новосибирские изоляты других генотипов НВoV - НВoV1 (RUS-NSC10-N1117), НВoV3 (RUS-NSC11-N2512) и

два изолята НВoV2 (RUS-NSC10-N386 и RUS-NSC10-N751) с использованием вышеописанных праймеров (таблица 3). ПЦР-фрагменты, соответствующие формам

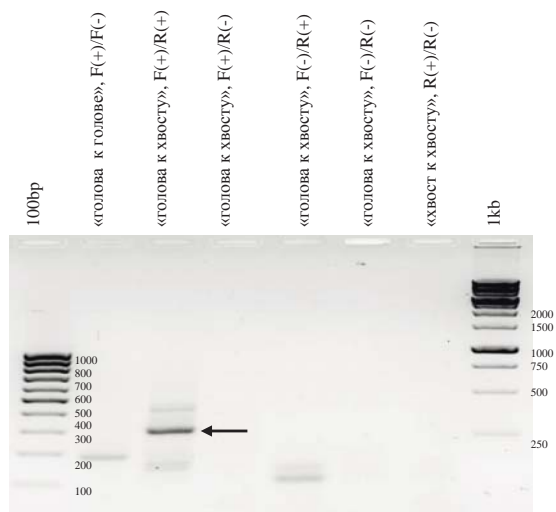


Рисунок 8. Пример продуктов гнездовой ПЦР со всеми возможными комбинациями пар праймерами. Стрелка указывает на фрагмент, который содержал последовательность НВoV4 «голова к хвосту»

вирусного генома в ориентации «голова к голове» или «хвост к хвосту» для всех проанализированных изолятов выявлены не были. При использовании в ПЦР ДНК изолята НВoV2 RUS-NSC10-N386 и праймеров F+/R+ («голова»/«хвост») были обнаружены структуры, соответствующие форме с ориентацией «голова-к-хвосту» (данные не приводятся).

На следующем этапе ампликон, полученный на ДНК матрице изолята НВoV4 RUS-NSC11-N2657 и содержащий последовательность «голова к хвосту» (рисунок 8), был клонирован в рGEM-T вектор. Клонирование полученных ампликонов, содержащих концевые нетранслируемые участки генома изолятов НВoV2 RUS\_NSC\_10-N386 и НВoV4 RUS\_NSC\_11-N2657 с последующим секвенированием ПЦР-фрагментов из индивидуальных клонов позволило установить нуклеотидные последовательности полных геномов этих изолятов, включая концевые шпилечные структуры. При этом выявилась гетерогенность терминальных последовательностей НВoV2 и НВoV4, что, возможно, является следствием сложной вторичной структуры этого района вирусного генома. Гетерогенность терминальных последовательностей также была обнаружена ранее при секвенировании концевых районов генома СпВoV3 был открыт в работе [Li et al., 2013].

Важную роль в репликации НВoV играют концевые шпилечные структуры некодирующих районов, поэтому были проанализированы их вторичные структуры. Ранее были предсказаны вторичные структуры концевых некодирующих районов

НВoV2 и НВoV3 и проведено их сравнение [Zhao et al., 2012; Капоор et al., 2011]. Аналогичным способом мы провели предсказание вторичных структур всех генотипов НВoV, включая новосибирские изоляты НВoV2 RUS\_NSC\_10-N386 и НВoV4RUS-NSC11-N2657 (рисунок 9).

При сравнении выведенных вторичных структур можно заключить, что, несмотря на значительные отличия в нуклеотидных последовательностях, наблюдается сходство их вторичных структур. Во всех случаях присутствуют 3' концевой стебель с петлей, шпилька-1, имеющая «структуру кроличьих ушей», и 5' концевой кластер стеблей и петель. Можно отметить, что в большинстве случаев образуются протяженные шпильки, характеризующиеся высокими значениями свободной энергии, особенно для новосибирских изолятов НВoV4, НВoV2 и штамма НВoV1 Salvador. Возможно, эти шпильки стабилизируют вторичную структуру концевых участков генома НВoV.

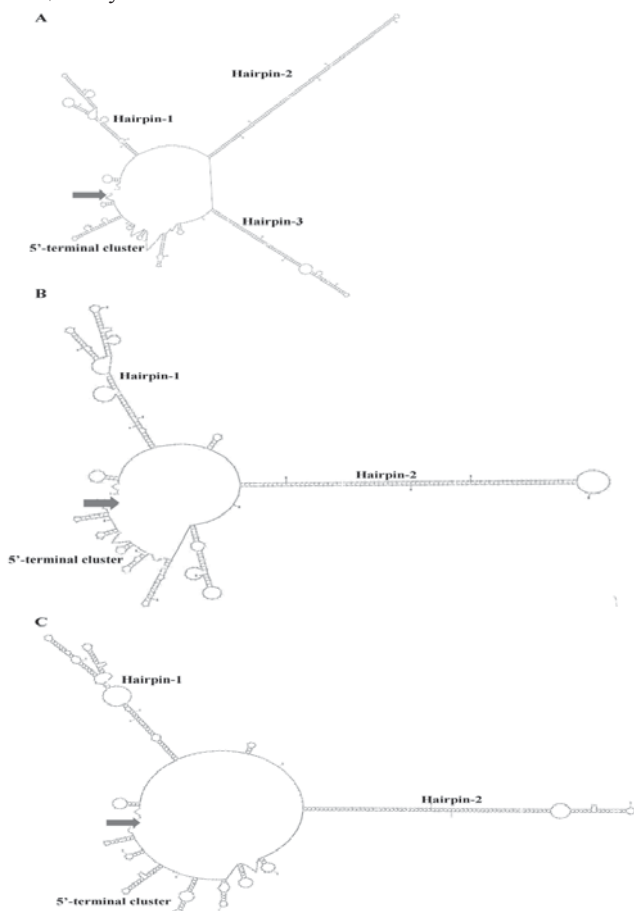


Рисунок 9.  
Предсказанные структуры концевых некодирующих районов НВoV1 Salvador (А), НВoV4 RUS-NSC11-N2657 клон 10 (В) и НВoV2 RUS-NSC10-N386 клон 25 (С). Стрелка указывает на расположение области, содержащей гены, кодирующие NS, NP, и VP

Вместе с тем, отсутствие структур, присущих механизму репликации по принципу катящейся шпильки, обнаруживаемых у других парвовирусов, и выявление ковалентно замкнутых кольцевых структур генома негативной полярности для всех генотипов НВoV ставит вопрос о необходимости более детального изучения репликации бокавирусов. Кроме того, отсутствие достоверных отличий во встречаемости НВoV у больных и здоровых детей в Новосибирске, подтверждаемое результатами исследований и в других регионах мира, обнаружение быстрой, трудно объяснимой смены генетических вариантов циркулирующих НВoV и ряд других вопросов делает необходимым проведение дальнейших исследований молекулярно-генетических особенностей этого относительно недавно открытого вируса.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено комплексное исследование молекулярно-эпидемиологических особенностей бокавирусной инфекции у детей раннего возраста, госпитализированных с диагнозом ОКИ в 2010-2012 гг. в Новосибирске и показано, что

- бокавирусы человека, выявленные в среднем в 1,2 % (62/5264) клинических образцов от больных детей, не являются высоко значимой этиологической причиной этих заболеваний;

- выраженной сезонной зависимости бокавирусной инфекции в исследуемый период не обнаружено;

- чаще всего бокавирусы выявлялись у детей в возрасте от 6 до 8 месяцев, 87 % детей с бокавирусной инфекцией были младше одного года и более 96 % заболевших бокавирусами были младше полутора лет;

- бокавирусы выявлялись в виде моноинфекций приблизительно в половине случаев (54,8 %), при инфекциях смешанной этиологии чаще всего они встречались в сочетании с ротавирусами группы А и норовирусами II геногруппы.

2. Исследование молекулярно-генетического разнообразия изолятов бокавирусов человека, выявленных в 2010-2012 гг. продемонстрировало, что

- в Новосибирске доминировали изоляты бокавируса второго генотипа (НВoV2, 56,4 %), при этом встречаемость НВoV2В составила 80 % от общего количества НВoV2;

- изоляты бокавируса первого генотипа (НВoV1) встречались в 38,7 % случаев, изоляты НВoV3 и НВoV4 обнаруживались в единичных образцах (1 -НВoV3, 2 - НВoV4);

- с течением времени происходило изменение спектра генетических вариантов НВoV.

3. Определены нуклеотидные последовательности геномов шести изолятов НВoV (1 изолят НВoV1, 2 – НВoV2, 1 – НВoV3 и 2 изолята НВoV4), выявленных в Новосибирске, и показано, что геномные последовательности изолятов НВoV1,

НВoV2 и НВoV4 кластеризовались с таковыми изолятов из различных географических областей, относящихся к соответствующему генотипу. Новосибирский изолят НВoV3 возник в результате рекомбинации между генотипами НВoV3 и НВoV4; сайт рекомбинации (в позиции 3270 н. о.), совпадающий с «горячей» точкой рекомбинации бокавирусов, расположен между районами с аномально низким и аномально высоким GC-составом генома.

4. Установлено, что скорость изменчивости генома НВoV составляет около  $9 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год. Показано, что дивергенция генотипов НВoV от общего предшественника произошла несколько сотен лет назад, а современные изоляты НВoV дивергировали внутри генотипов в течение последних 50 лет.

5. Впервые установлено, что репликативные интермедиаты НВoV4 имеют структуру «голова к хвосту», что свидетельствует о использовании этим вирусом механизма репликации по принципу «катящегося кольца»; впервые обнаружен полиморфизм нуклеотидных последовательностей концевых районов у НВoV.

#### **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:**

1. Babkin I.V., Tyumentsev A.I., Tikunov A.Y., Kurilshikov A.M, Ryabchikova E.I., Zhirakovskaya E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. Evolutionary time-scale of primate bocaviruses // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. – V. 14. – P. 265-274.
2. Tyumentsev A.I., Tikunova N.V., Tikunov A.Y., Babkin I.V. Recombination in the evolution of human bocavirus // *Infect. Genet. Evol.* – 2014 – V. 28. –P. 11-14.
3. Babkin I.V., Tyumentsev A.I., Tikunov A.Y., Zhirakovskaia E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. A study of the human bocavirus replicative genome structures // *Virus Res.* – 2015. – V. 195. – P. 196-202.
4. Тюменцев А.И., Бабкин И.В., Тикунов А.Ю., Нетесов С.В., Тикунова Н.В. Молекулярно-эпидемиологическое исследование бокавирусной инфекции у детей раннего возраста в новосибирске, 2010- 2012 гг. секвенирование полных геномов бокавирусов 1-4 генотипов // Сборник «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» - 2013. – С. 102-104.
5. Тюменцев А.И., Тикунов А.Ю., Курильщикова А.М., Жиравковская Е.В., Нетесов С.В., Тикунова Н.В. Молекулярная диагностика и генотипирование бокавирусов человека у детей раннего возраста с острой кишечной инфекцией в Новосибирске в 2010-2012 гг. //Сборник «Молекулярная диагностика 2014» -2014. – Т. 1. -С. 394-395.