

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ  
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»  
(Институт полиомиелита)**

*На правах рукописи*

**ШУСТОВА**

**Елена Юрьевна**

**РОЛЬ РЕКОМБИНАЦИИ И МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕХОДА В  
ВОЗНИКНОВЕНИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВАРИАНТОВ  
ЭНТЕРОВИРУСОВ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
член-корреспондент РАН, профессор РАН,  
доктор медицинских наук  
Лукашев Александр Николаевич

Москва-2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Общая характеристика энтеровирусов.....	8
1.1.1. Современные представления об энтеровирусах .....	8
1.1.2. Классификация энтеровирусов .....	10
1.1.3. Строение вириона и генома.....	11
1.1.4. Жизненный цикл вируса.....	14
1.1.5. Клеточные рецепторы энтеровирусов.....	15
1.1.6. Физико-химические свойства вириона энтеровируса .....	17
1.1.7. Клинические проявления энтеровирусной инфекции .....	18
1.2. Рекомбинация энтеровирусов .....	19
1.3. Байесовский подход в филогенетике.....	23
1.4. Рекомбинация у неполиомиелитных энтеровирусов .....	25
1.5. Межвидовая передача энтеровирусов .....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1. Штаммы вирусов и культуры клеток, использованные в работе .....	35
2.1.1. Штаммы энтеровирусов вида А.....	35
2.1.2. Штаммы энтеровирусов вида В .....	41
2.1.3. Прототипные штаммы энтеровирусов .....	41
2.1.4. Клеточные линии.....	42
2.2. Молекулярно-биологические методы исследования .....	43
2.2.1. Выделение РНК .....	43
2.2.2. Обратная транскрипция <i>in vitro</i> .....	43
2.2.3. Постановка полимеразной цепной реакции .....	44
2.2.4. Электрофорез ПЦР-продуктов и очистка образцов.....	51
2.3. Определение нуклеотидной последовательности .....	52
2.4. Анализ нуклеотидных последовательностей.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54

3.1. Получение нуклеотидных последовательностей энтеровирусов .....	54
3.2. Филогенетическое взаимоотношение участка генома VP1 энтеровирусов человека вида А .....	57
3.3. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 2С энтеровирусов человека вида А .....	60
3.4. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 3D энтеровирусов человека вида А .....	63
3.5. Анализ филогенетических отношений трех областей генома энтеровирусов человека вида А .....	66
3.6. Филогенетическое взаимоотношение штаммов О72 и Т75 энтеровирусов вида В.....	83
3.7. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 2С вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В.....	87
3.8. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 3D вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В.....	89
3.9. Анализ полногеномных последовательностей вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В .....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	94
ВЫВОДЫ.....	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Энтеровирусы входят в число наиболее изученных вирусов человека благодаря их раннему открытию в 1950-х гг. и легкому культивированию в культуре клеток. Известно более ста типов (серотипов) неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), которые вызывают различные заболевания. Энтеровирусы характеризуются большой генетической изменчивостью, основанной на двух эволюционных механизмах: мутации и рекомбинации. Отсутствие корректирующей активности 3D-полимеразы приводит к точечным мутациям и генерации популяции родственных последовательностей. В биосфере энтеровирусы благодаря частой рекомбинации представляют собой резервуар генетической информации, включающий ограниченное количество наборов капсидных генов, определяющих конечное число типов, и практически неограниченное «облако» генов неструктурных белков, которые в пределах таксономического вида могут в любой комбинации сочетаться с генами структурных белков. Этим можно объяснить невозможность привязать тип энтеровируса к определенному заболеванию: разные типы могут вызывать сходные клинические проявления, а один тип – разные заболевания. Частые рекомбинационные события потенциально способствуют возникновению новых типов с эпидемическим потенциалом. По предварительным данным, закономерности рекомбинации и эволюции у разных видов и даже типов энтеровирусов могут быть различными, однако целостной картины эволюционной и рекомбинационной динамики энтеровирусов на момент начала данного исследования не было.

Способность энтеровирусов к межвидовой передаче также может увеличивать риск возникновения новых вспышек инфекционных заболеваний пандемического характера. В XX веке энтеровирусы вызвали пандемию полиомиелита, менее известные пандемии острого геморрагического конъюнктивита (EV-D70) и менингоэнцефалита (EV-A71), причем источник этих вирусов не установлен. Поэтому особый интерес представляют циркулирующие энтеровирусы, вызывающие заболевания у животных и способные к передаче между животными и человеком. Каждый случай такой передачи важен для характеристики потенциала энтеровирусов как источника новых заболеваний.

### **Степень разработанности темы**

На момент начала исследования закономерности рекомбинации у энтеровирусов вида А были изучены только в общем виде. Была изучена динамика рекомбинации отдельных типов на основании анализа небольшого количества изолятов энтеровирусов вида А. В качестве мишени для изучения рекомбинации рассматривали 2 структурные области генома, кодирующие белки

VP1 и VP4 и одну неструктурную область, кодирующую белок 3D [1]. В связи с большей распространенностью и высоким процентом выделяемости из клинических образцов, большинство исследований были направлены на изучение рекомбинационных событий у энтеровирусов вида В, и на сравнение видов, но не отдельных типов [2–6]. Изучение динамики рекомбинационных событий изолятов энтеровирусов вида А с большим временным охватом и сравнением разных типов ранее не проводилось и имеет как фундаментальное значение, так и важно для оценки потенциала этих вирусов. Также были описаны несколько случаев межвидового перехода энтеровирусов, в частности, возникновение эпизоотии классического вируса везикулярной болезни свиней (ВВБС) в 1961 году в результате смены хозяина вирусом CV-B5 [7–10]. При этом возникновение эпизоотии везикулярной болезни свиней (ВБС) в 1975 году в Советском Союзе было менее известно и молекулярно-генетическое исследование этой эпизоотии не проводилось.

### **Цель работы**

Изучение закономерности рекомбинационных событий у различных типов энтеровирусов и их роль в реализации межвидового перехода.

### **Задачи работы**

1. Сформировать выборку энтеровирусов вида А различных типов с широким географическим и временным охватом.
2. Провести филогенетический анализ энтеровирусов вида А по трем участкам генома с использованием метода молекулярного датирования.
3. Оценить общие закономерности рекомбинации у энтеровирусов вида А друг относительно друга и относительно прототипных штаммов энтеровирусов.
4. С помощью филогенетического анализа участков генома вирусов везикулярной болезни свиней изучить эпизод межвидового перехода.

### **Научная новизна**

Важным свойством энтеровирусов является их способность к обширной рекомбинации. В данной работе впервые выполнен анализ рекомбинации у энтеровирусов вида А как единого целого. Изучена динамика глобального пула генетической информации в трех участках генома, включая анализ особенностей отдельных типов. Впервые изучена временная динамика рекомбинации у разных типов этого вида. Впервые показано, что граница областей VP1-2A, считавшаяся «горячей точкой» рекомбинации, может быть артефактом, наблюдаемым по причине разной силы филогенетического сигнала в этих участках генома, а частота рекомбинации между областями генома VP1/2C и 2C/3D примерно сопоставима.

Рекомбинация может способствовать возникновению новых заболеваний человека и животных и привести к увеличению патогенности вирусов. У энтеровирусов рекомбинация также связана с их возможностью к межвидовой передаче. Было исследовано происхождение вирусов T75 и O72, вызвавших две крупные вспышки везикулярной болезни свиней в Советском Союзе. Ранее сообщений о происхождении второй вспышки, вызванной вирусом T75, в международной литературе опубликовано не было, молекулярное исследование не проводилось.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Рекомбинация является важнейшим фактором эволюции вирусов с потенциально важными с медицинской точки зрения последствиями, а энтеровирусы отличаются высокой динамикой рекомбинационных событий. В результате данного исследования было проанализировано 80 штаммов энтеровирусов вида А с широким временным и географическим охватом выделения. Это позволило разделить циркулирующие типы энтеровирусов вида А на 3 группы с разной частотой рекомбинации.

Учитывая высокую скорость накопления мутаций, частую рекомбинацию у энтеровирусов, а также возможность межвидового перехода энтеровирусов, очевидно, что необходимо дальнейшее изучение пути передачи энтеровирусов и реализация более широкого филогенетического анализа, чем применяется сейчас.

В результате работы депонированы в GenBank 240 нуклеотидных последовательностей трех областей генома (VP1, 2С и 3D) энтеровирусов вида А, выделенные в разных городах России и странах СНГ, последовательность структурной области генома, кодирующей белок VP1 штамма O72 энтеровируса вида В и полная нуклеотидная последовательность штамма T75 энтеровируса вида В, вызвавших вспышки везикулярной болезни свиней в Советском Союзе.

### **Методология и методы исследования**

В исследовании были использованы вирусологические (выделение вирусов на культуре клеток, идентификация энтеровирусов в реакции нейтрализации), молекулярно-биологические (выделение РНК, ПЦР, секвенирование) и филогенетические методы.

### **Личный вклад автора**

Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Лично или с участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Частота естественной рекомбинации у неполиомиелитных энтеровирусов вида А значительно варьируется у разных типов.
2. Время полужизни циркулирующих энтеровирусов вида А без рекомбинации варьируется от 2 до 28 лет в зависимости от типа.
3. Частота рекомбинации между участками генома структурной области VP1 и неструктурной 2С не выше, чем между областями генома 2С и 3D.
4. Возникновение ВВБС, вызвавшего эпизоотию в Советском Союзе в 1972 г. и 1975 г., произошло в результате двух независимых межвидовых переходов энтеровирусов человека.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Материалы диссертации были представлены на Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» к 90-летию Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург, Россия, 5-7 июня 2013 года), V Европейском конгрессе вирусологов (Лион, Франция, 11-14 сентября 2013), Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2024» (Москва, Россия 16-17 апреля 2024).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Положения диссертации соответствуют пунктам 1, 4, 8 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

### **Публикации**

Основные результаты исследования отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ: 1 статья - в журнале, рекомендованном ВАК, 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в библиографических базах – Web of Science, Scopus, PubMed.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, включает 25 таблиц и 39 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы включает 227 источников, из них 13 отечественных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика энтеровирусов

#### 1.1.1. Современные представления об энтеровирусах

Род энтеровирус относится к одному из самых больших вирусных семейств - *Picornaviridae*, его название произошло от итальянского слова «*riccio*» - маленький (это одни из самых маленьких вирусов - размером около 30 нм) и «*RNA*» (РНК- рибонуклеиновая кислота - вещество наследственности вирусов). Это семейство вирусов включает в себя пятьдесят родов [11]. Полиомиелит как заболевание предположительно известен с древних времен и, вероятно, впервые был изображен на стелле времен XVIII египетской династии (1580–1350 гг. до н. э.) [12]. С 1800-х годов можно найти первые клинические описания случаев паралича совместно с лихорадкой [13]. Первое название этого заболевания – болезнь Гейне-Медина в честь немецкого хирурга-ортопеда Якоба Гейне (J.Heine), который в 1840 году подробно описал последствия, и шведского педиатра Карла Оскара Медина (K.O. Medin), также исследовавшего данное заболевание. А уже в 1874 данному заболеванию было присвоено современное название – полиомиелит [14]. Различают 3 типа вируса полиомиелита: полиовирус тип 1, полиовирус тип 2, полиовирус тип 3. Доктора Ландштейнер (K. Landsteiner) и Поппер (E. Popper) в 1908 году впервые открыли инфекционную природу болезни, вызываемой вирусом полиомиелита. Они провели ряд экспериментов по заражению обезьян гомогенатом тканей ЦНС (центральная нервная система) от больных людей [5]. Это открытие послужило новым толчком в изучении полиомиелита в начале XX века. Число парализованных и погибших детей к этому времени исчислялось десятками тысяч. Но после вакцинации, которая масштабно началась в конце 1950-х годов, заболеваемость значительно снизилась. В 1988 году было зарегистрировано 350 000 случаев эндемического полиомиелита в 125 странах. В том же году Всемирной ассамблеей здравоохранения была принята программа о глобальной ликвидации полиомиелита [15,16]. На сегодня эта задача все еще не завершена. Препятствия на пути к полной ликвидации включают плохое соблюдение программы и ограниченный доступ к здравоохранению в отдаленных эндемичных районах [17].

В 1948 году был выделен первый неполиомиелитный энтеровирус (НПЭВ) – вирус Коксаки А. Вирус был выделен Гилбертом Доллдорфом (G. Dalldorf) и Грейксом Сайклсом (G. Sickles) при заражении мышей-сосунков материалом из фекалий парализованного ребенка из города Коксаки (Coxsackie) в штате Нью-Йорк Соединенных Штатов Америки (США), откуда и пошло название [18]. В 1949 г. доктором Мелником (J. Melnick) был изолирован первый вирус Коксаки В при заражении новорожденных мышей материалами от детей, больных серозным менингитом [19].



Между тем, более широкое использование культур клеток человека выявило в клиническом материале другую группу вирусов, которые не были патогенными для лабораторных животных, но оказывали цитопатическое действие в культуре клеток [20,21]. Поскольку эти агенты были выделены вначале из содержимого кишечника здоровых детей, их назвали вирусами - «сиротами» (сиротами, потому что они не вызывали заболевания у мышей, по-видимому, во время первоначальной изоляции у людей) - ЕСНО (Enteric Cytopathic Human Orphan) вирусами [22]. В настоящее время хорошо известно, что эховирусы могут вызывать у людей множество серьезных заболеваний, в том числе асептический менингит [23].

Начиная с 1970 года было принято решение отказаться от старых названий и называть новые вирусы «энтеровирусами» под номерами, начиная с 68 [24,25]. Особый интерес для здравоохранения представлял энтеровирус 71 типа (EV-A71). Первый штамм энтеровируса 71 типа BrCr был выделен в Калифорнии в 1969 году от пациентов с заболеванием центральной нервной системы. Хотя асептический менингит был наиболее частым неврологическим проявлением инфекции EV-A71 с паралитическим полиомиелитоподобным заболеванием в Болгарии в 1975 г. [14,19,26,27].

Особое медицинское значение имеет способность НПЭВ вызывать тяжелые неврологические проявления. Вирус CV-A7 первым стал известен как возбудитель полиомиелитоподобного паралитического заболевания. В 1952-1968 годах он вызвал вспышки полиомиелитоподобной инфекции среди детей в Казахстане, Шотландии, Швейцарии. Заболевание могло проявляться в виде любой клинической формы полиомиелита, включая спинальную, бульбарную, понтинную, церебральную форму, а также сочетанные формы [28].

ВВБС был впервые выделен от свиней в Ломбардии, Италии в 1966 году, где из-за сходства симптомов был поставлен первоначальный диагноз - ящур [29]. Позже Гонконг был постулирован как место происхождения ВВБС, учитывая, что он был вторым местом, где был обнаружен ВВБС (в 1970 г.) [7,9]. С тех пор многочисленные вспышки произошли в Европе и Азии [8,30–32].

Хотя свиньи в настоящее время являются единственным известным хозяином ВВБС, исследователи предполагают, что ВВБС эволюционировал от общего предка CV-B5 в результате перехода видового барьера от человека к свинье и последующей адаптации [7,30].

Время не стоит на месте, и мы повсеместно встречаем новые штаммы энтеровирусов. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV <https://ictv.global/>), энтеровирусы, открытые после 1976 года, называются «новыми» энтеровирусами, и не «серотипами», а «типами» или «генотипами», а именно от EV-D68 до нынешнего EV-A121, всего 53 генотипа [33–36].

## 1.1.2. Классификация энтеровирусов

Энтеровирусы выделены в отдельную таксономическую группу в 1957 году, позднее их классифицировали как род в семействе пикорнавирусов (*Picornaviridae*). На данный момент род *Enterovirus* включает 12 видов энтеровирусов (Энтеровирусы вида А, В, С, D, Е, F, G, H, I, J, K, L) и 3 вида риновирусов (Риновирусы вида А, В, С). Актуальная классификация энтеровирусов представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Классификация рода *Enterovirus* [37]

№	Виды энтеровирусов	Основные представители
1	Энтеровирусы вида А	Coxsackievirus A2-8, A10, A12, A14, A16; Enterovirus A71, A76, A89-92, A114, A119-121, A123-125;
2	Энтеровирусы вида В	Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33; Coxsackievirus A9, B1-6; Enterovirus B69, B73-75, B77-88, B93, B97, B98, B100, B101, B106, B107; B110-114; Swine vesicular disease virus;
3	Энтеровирусы вида С	Coxsackievirus A1, A11, A13, A17, A19-22, A24; Enterovirus C95, C96, C99, C102, C104, C105, C109, C113, C116-118; Poliovirus 1-3;
4	Энтеровирусы вида D	Enterovirus D68, D70, D94, D111, D120;
5	Энтеровирусы вида Е	Enterovirus E1-5;
6	Энтеровирусы вида F	Enterovirus F1-7;
7	Энтеровирусы вида G	Enterovirus G1-20;
8	Энтеровирусы вида H	Enterovirus H1;
9	Энтеровирусы вида I	Enterovirus I1, I2;
10	Энтеровирусы вида J	Enterovirus J1, J103, J108, J112, J115, J121;
11	Энтеровирусы вида K	Enterovirus K1-2;
12	Энтеровирусы вида L	Enterovirus L1;
13	Риновирусы вида А	Rhinovirus A1, A1B, A2, A7-13, A15, A16, A18-25, A28-34, A36, A38-41, A43-47, A49-51, A53-68, A71, A73-78, A80-82, A85, A88-90, A94-96, A98, A100, A101-108;
14	Риновирусы вида В	Rhinovirus B3-6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91-93, B97, B99, B100-104;
15	Риновирусы вида С	Rhinovirus C 1-51, C54-57;

## 1.1.3. Структура вириона и генома

Вирион энтеровирусов безоболочечный, состоит из капсида, окружающего одноцепочечную молекулу РНК, имеет сферическую форму и размер около 30 нм (Рисунок 1).

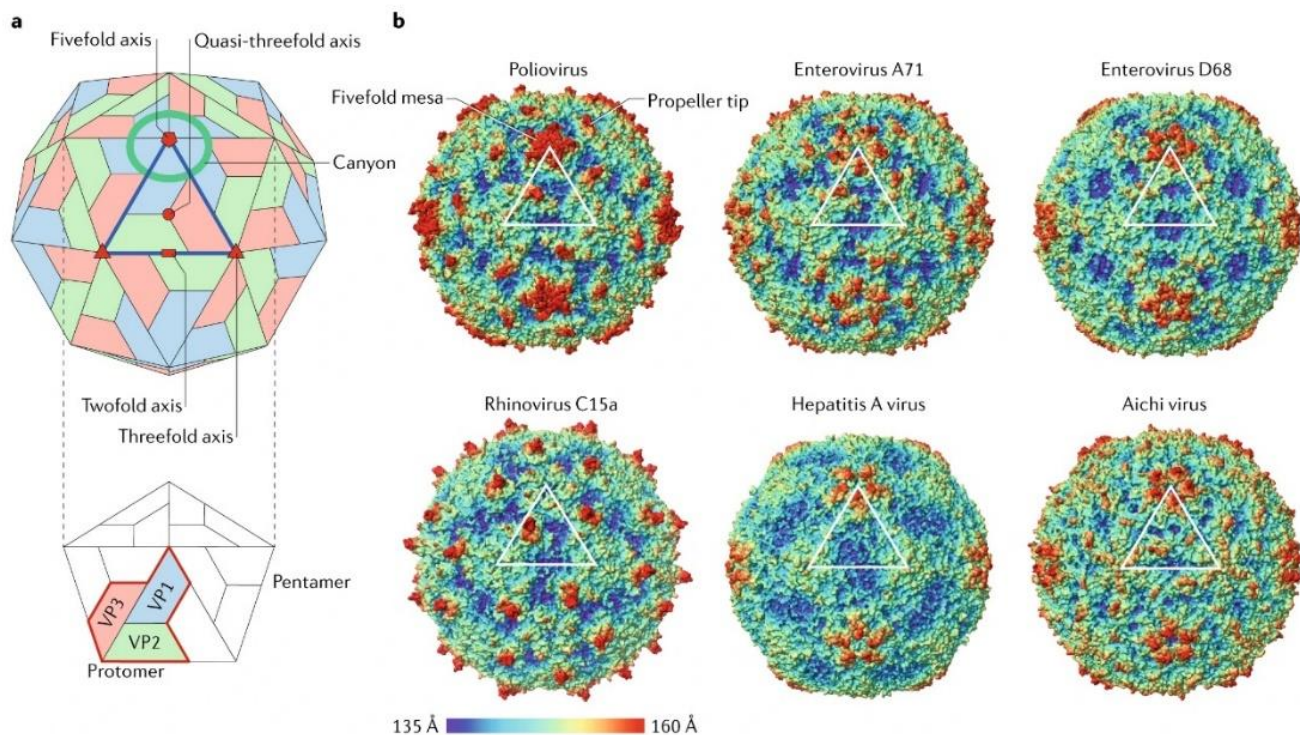


Рисунок 1 – а) Схематическое изображение частицы пикорнавируса: б) Сравнение поверхностей капсидов различных пикорнавирусов, принадлежащих к роду *Enterovirus* (полиовирус, энтеровирус А71, энтеровирус D68 и риновирус С15а); роду *Hepatovirus* (вирус гепатита А); и роду *Kobuvirus* (вирус Аичи). Поверхности вирионов окрашены в зависимости от их расстояния от центра вириона, что показано на цветовой шкале [38]

Липидная оболочка отсутствует. Капсид энтеровирусов характеризуется икосаэдральной симметрией и состоит из 60 протомеров. Каждый протомер содержит по одной молекуле белков VP1, VP2, VP3 и VP4. На поверхности капсида 5 белков VP1 образуют плато в форме звезды, окруженное каньоном. Каньон представляет собой рецептор-связывающий сайт. Белок VP4 расположен внутри капсида и не участвует в антигенном взаимодействии (Рисунок 2). Однако, не все пикорнавирусы имеют каньон. Роды *Aphthovirus* и *Cardiovirus* имеют более гладкий рельеф [25,39,40].

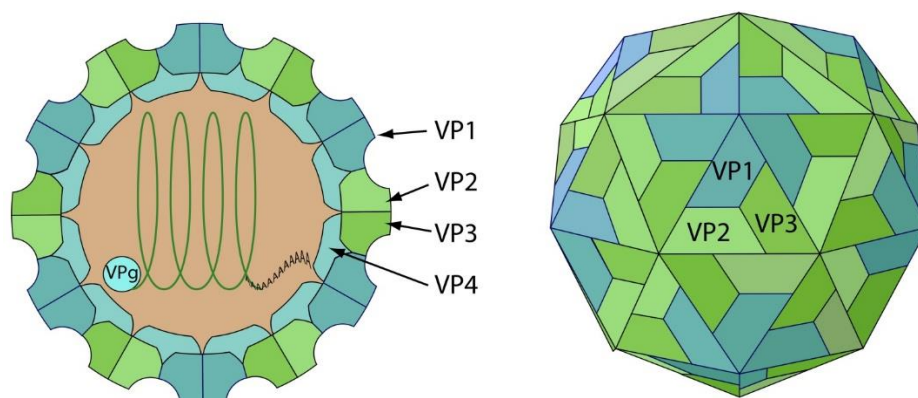


Рисунок 2 – Схематическое изображение вириона пикорнавирусов [41]

Геном энтеровирусов представлен одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности длиной около 7500 нуклеотидов (нт). Энтеровирусная геномная РНК представлена 5' - нетранслируемой областью (5'НТО) длиной около 750 нт, которая ковалентно связана фосфамидной связью с белком VPg (virion protein, genome linked) [42]. Следующие около 750 нуклеотидов составляют элемент вторичной структуры, необходимый для инициации трансляции вирусной РНК по кэп-независимому механизму, область внутренней посадки рибосомы – IRES (internal ribosome entry site) [40,42–44]. Энтеровирусный геном имеет одну рамку считывания. Вирусный геном кодирует полипротеин массой около 250 кДа, который разрезается вирусными протеазами на структурные и неструктурные белки [45]. 3'-конец генома полиаденилирован [46,47]. Нетранслируемые области на 5' и 3'-концах генома содержат структурированные участки РНК, регулирующие процессы репликации генома и обуславливающие стабильность вирусной РНК в клетке: *oriL* (origin left), *oriR* (origin right) [40,48,49]. Регуляторные структурные элементы находятся и в кодирующей области генома (Рисунок 3).

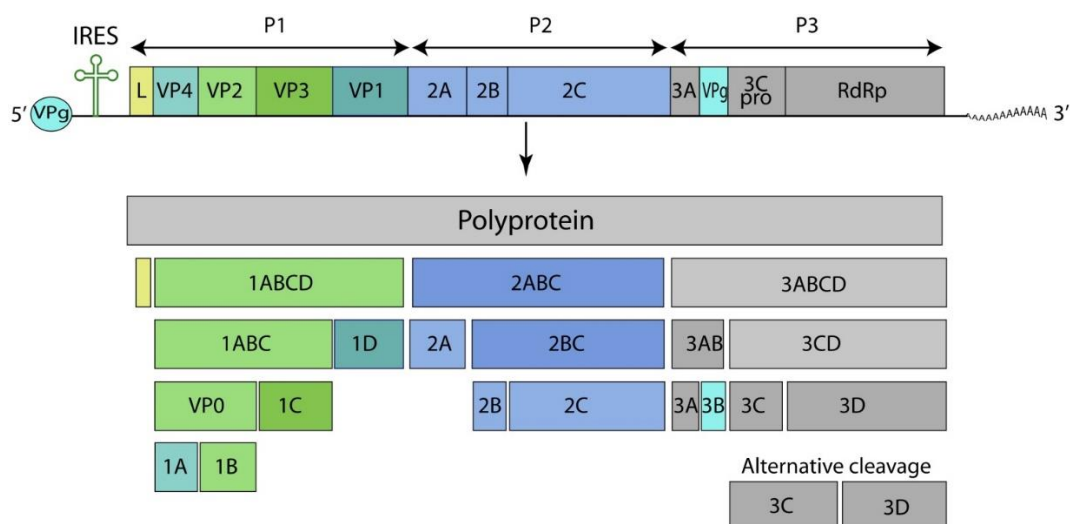


Рисунок 3 – Схематическое изображение структуры энтеровирусного генома [41]

В результате трансляции образуется один полипротеин, который разрезается вирусными протеазами 2А и 3С на 3 белковых продукта-прекурсора Р1, Р2 и Р3, которые в дальнейшем разрезаются на 11 белков. Белок - предшественник Р1 кодирует структурные белки, которые образуют капсид энтеровируса: VP1, VP2, VP3 и VP4. Белок - предшественник Р2 является предшественником неструктурных белков 2А, 2В и 2С (Таблица 2). Белок 2А (цистеиновая протеаза), отвечает за разрезание полипептида между белками VP1 и 2А, за выключение кэп-зависимой клеточной трансляции, а также необходим для инициации синтеза «-» цепи РНК. Белок 2В участвует в синтезе вирусной РНК на ранних этапах [42,50]. Белок - предшественник Р3 кодирует неструктурные белки 3А, 3В, 3С и 3D (Таблица 2). Их промежуточные предшественники в виде слитных белков 3АВ и 3СD выполняют много различных функций. 3В - короткий пептид VPg, ковалентно связывающийся с 5' концом вирусной РНК и обеспечивающий прайминг при репликации РНК. 3С - вторая вирусная протеаза; которая отрезает все белки полипептида друг от друга, кроме связей VP4-VP2 и VP1-2А. 3D - вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза [42,51,52].

Таблица 2 – Неструктурные белки энтеровирусов

№	Вирусные белки	Характеристика	Функции
1	2А	протеаза	расщепляет вирусный полипротеин и специфические белки хозяина. отвечает за автокаталитическое расщепление между областями Р1 и Р2
2	2В	гидрофобный белок	индуцирует и связывает структурные перестройки внутриклеточных мембран
3	2С	белок, имеющий гомологию с хеликазами	участвует в снятии оболочки с вируса, перестройке мембран клеток-хозяев, репликации РНК, инкапсидации, морфогенезе, АТФазной, геликазной и шаперонной активности
4	3А	гидрофобный белок	участвует в формировании репликационного комплекса
5	3В	VPg	действует как праймер для репликации вирусной РНК и остается ковалентно связанным с вирусной геномной РНК
6	3С	Основная вирусная протеаза	опосредует протеолитический процессинг полипротеина разрезает полипротеин между областями генома Р2 и Р3
7	3D	РНК-зависимая РНК-полимераза	реплицирует вирусную геномную РНК

## 1.1.4. Жизненный цикл вируса

Жизненный цикл энтеровирусов начинается со связывания с одним или несколькими рецепторами на клеточной поверхности, что приводит к рецепторно-опосредованному эндоцитозу. Энтеровирусы могут использовать разные пути эндоцитоза в зависимости от типа вируса и типа клеток. Связывание рецепторов и/или изменение pH в эндосомной системе вызывают раскрытие оболочки вируса и высвобождение вирусного генома из капсида в цитоплазму через поры в эндосомной мембране [50]. Хотя разные энтеровирусы могут использовать разные рецепторы и пути проникновения, многие этапы после проникновения очень консервативны.

После проникновения вирусной РНК в клетку геном пикорнавирусов служит матрицей для образования вирусных белков (Рисунок 4). Репликация у энтеровирусов происходит в цитоплазме клетки-хозяина. Вирусная РНК транслируется клеточной системой трансляции и выступает в роли мРНК. Затем вирусная РНК копируется в (-)РНК для создания промежуточного продукта репликации - двухцепочечной РНК [25,42]. Отрицательная цепь служит шаблоном для синтеза новых положительных цепей. Вновь синтезированные вирусные РНК либо служат в качестве матрицы для дальнейшей трансляции и репликации, либо инкапсидируются в новые вирионы. Репликация вирусного генома происходит на микросомальных мембранах при участии 3D полимеразы, клеточных белков и некоторых вирусных белков [42,53].

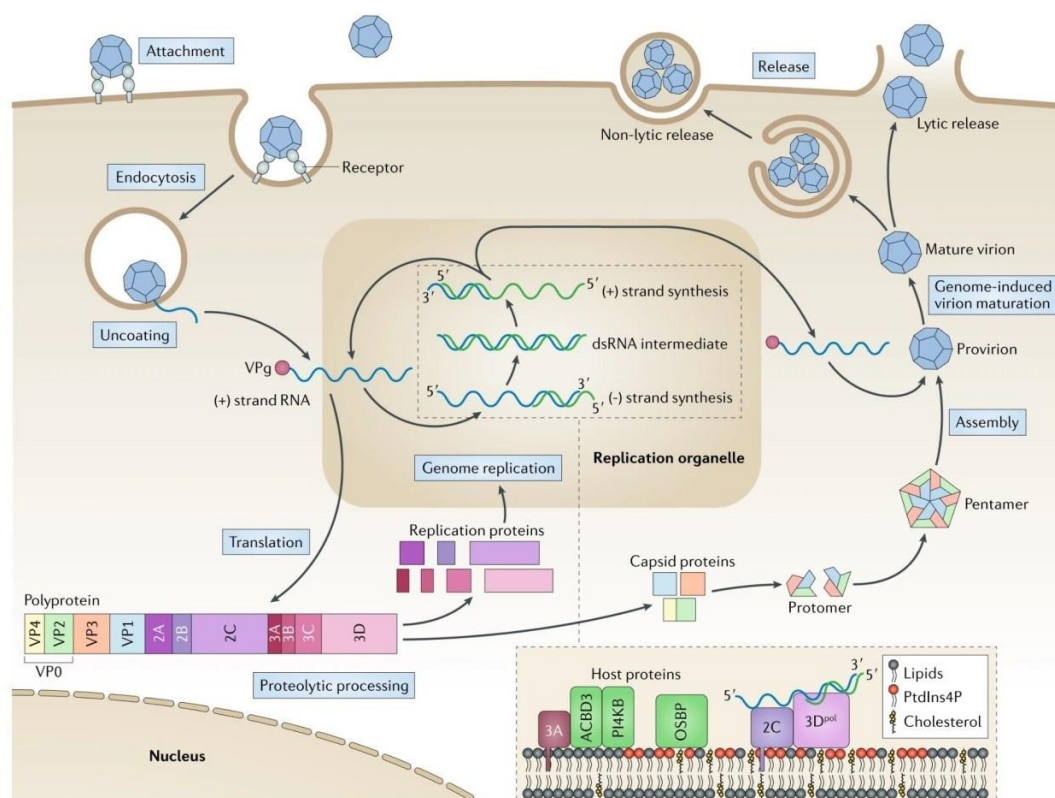


Рисунок 4 – Жизненный цикл вируса [38]

Капсидные белки VP0, VP1 и VP3 образуют протомер, который олигомеризуется в пентамер. Двенадцать пентамеров собираются в пустой прокапсид, содержащий 60 протомеров, он является необходимым этапом сборки вириона [54–56]. В настоящее время неизвестно, проникает ли вирусная РНК в собранный прокапсид, либо пентамеры собираются вокруг вирусного генома. После образования провириона у большинства пикорнавирусов белок VP0 расщепляется на VP4 и VP2 [57]. Выход новых вирусных частиц происходит после разрушения клетки-хозяина [58]. Полный цикл репликации энтеровируса занимает около 8 часов и приводит к образованию до 100000 новых вирусных частиц [42,59].

#### 1.1.5. Клеточные рецепторы энтеровирусов

Снятие оболочки капсида и высвобождение генома являются важными этапами жизненного цикла безоболочечного вируса после его связывания с клеточным рецептором. Клеточный тропизм, наблюдаемый у энтеровирусов, в значительной степени зависит от специфических рецепторов, доступных на клетках-мишенях. Энтеровирусы используют около 10 различных рецепторов для проникновения через мембрану клетки [55].

На сегодняшний день установлено несколько клеточных рецепторов, обеспечивающих проникновение энтеровирусов, такие как: трансмембранный гликопротеин 1 типа (CD155), известный как рецептор полиовируса (PVR), молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) для CV-A21 и CV-A24, рецептор-мусорщик B2 (SCARB2) и P-селектиновый гликопротеиновый лиганд-1 (PSGL-1) для EV-A71 и крингл, содержащий трансмембранный белок 1 (KREMEN1) для некоторых энтеровирусов вида А [38,60–63] (Рисунок 5). Для EV-B ранее сообщалось, что CD55 и CAR (химерный рецептор антигена) являются рецепторами для CV-B1, -B3, -B5 и некоторых других типов эховирусов. Интегрин  $\alpha_2\beta_1$  является рецептором для E1, в то время как интегрины  $\alpha\nu\beta_6$  и  $\alpha\nu\beta_3$  обеспечивают проникновение CV-A9 [64–67]. Среди вышперечисленных рецепторов EV-B CD55,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha\nu\beta_6$  и  $\alpha\nu\beta_3$  отвечают за прикрепление вируса, но ни один из них не вызывает конформационных изменений в вирусной частице - процесса, необходимого для снятия оболочки вируса и высвобождения генома [61,68].

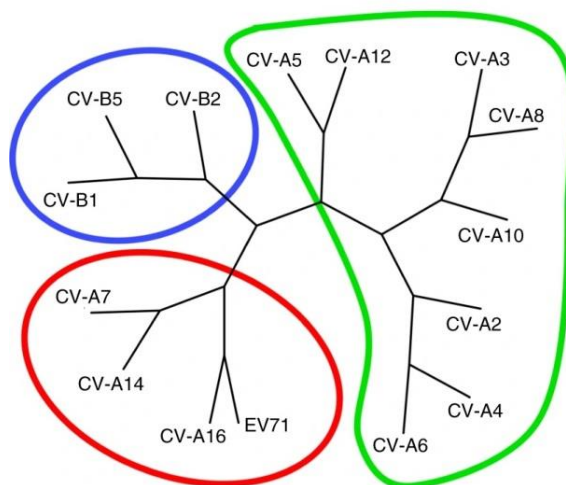


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево энтеровирусов, потенциально вызывающих энтеровирусный везикулярный стоматит, получено путем сравнения последовательностей капсидов. Вирусы, использующие в качестве рецепторов SCARB2- отмечены красным, CAR- синим и KREMEN1- зеленым [69]

В качестве клеточных рецепторов для EV-A71 описаны следующие:

- Рецептор PSGL-1 (P-селектиновый гликопротеиновый лиганд-1) – белок, экспрессируемый на поверхности лейкоцитов, который играет важную роль во время ранних стадий воспаления. N-конец белка PSGL-1 – участок связывания с EV-A71 [60];
- Рецептор SCRAMB-2 – это димерный трансмембранный белок как с C- так и с N- терминальными цитоплазматическими хвостами, который локализуется в основном в лизосомах и эндосомах [63];
- Аннексин II – фактор клеточной адгезии, который взаимодействует с EV-A71 посредством связывания с VP1 [70,71];
- Сиаловая кислота (СК) – EV-A71 может использовать СК-связанный гликан на эпителиальных клетках кишечника в качестве рецептора. Известно, что сиаловая кислота- $\alpha$ 2,3- галактоза (SA- $\alpha$ 2,3Gal) является рецептором вируса CV-A24 [72];
- Виментин – основной белок промежуточных филаментов клеток астроцитов и клеток, адаптированных к тканевой культуре. EV-A71 VP1 специфически связывается с промежуточным филаментом виментина, расположенным на поверхности клетки, который участвует в прикреплении EV-A71 к клеткам-хозяевам [73];
- Нуклеолин (NCL) клеточной поверхности – EV-A71 взаимодействует с нуклеолином через капсидный белок VP1 [74];
- Нейропилин 1 (NRP1) является новым кандидатом в рецепторы для передачи энтеровируса A71 (EV-A71) в клетки. В сконструированной форме рецептор NRP1 был способен распознавать и нейтрализовать EV-A71. NRP1 распознает EV-A71 через домен капсидного белка VP3 [75].



Необходимо отметить, что большинство описанных рецепторов пикорнавирусов (например, PVR, CAR и ICAM-1) представляют собой Ig-подобные белки, за исключением SCARB2 [55,76,77]. Большинство рецепторов связываются с участками «каньона» вирусной частицы. Это связывание запускает высвобождение «фактора кармана», который, представляет собой липид, размещенный в кармане под каньоном для стабилизации структуры вириона, что впоследствии вызывает конформационные изменения в вирусной частице [55]. Общие концепции проникновения энтеровирусов ранее были установлены с помощью криоэлектронной микроскопии структур нескольких энтеровирусов, таких как полиовирус, CV-B3, CV-A21 и CV-A24, в комплексах с их рецепторами [78–82].

#### 1.1.6. Физико-химические свойства вириона энтеровируса

Энтеровирусы чувствительны к высокой температуре и быстро погибают уже при 50°C. При этой температуре инактивация происходит в течение 30 минут (при 60°C – за 6-8 минут, при 65°C – 2,5 минуты, при 80°C – за 0,5 минут, при 100°C – практически мгновенно) [18]. При добавлении хлористого магния в одномолярной концентрации к вирусной суспензии титр вируса сохраняется при 50°C около часа. Однако в этих условиях при температуре 37°C вирус сохраняет свою жизнеспособность 50-65 дней [83].

При комнатной температуре энтеровирус может храниться несколько дней. Хранение в обычном холодильнике на +4°C без потери активности – несколько недель, а при заморозке от -20°C вирус сохраняется в течение многих лет. Пикорнавирусы выдерживают многократные циклы заморозки-разморозки без потери активности.

Энтеровирусы длительное время могут сохраняться в воде, например, вирус E7 сохраняет жизнеспособность в водопроводной воде 18 дней, в речной – 33 дня, в очищенных сточных водах – 65 дней, в осадке сточных вод – 160 дней.

Энтеровирусы устойчивы к кислой среде при pH 3-5 (в течение 1-3 часов) - это отражение условий их существования, поскольку они должны пройти через пищеварительный тракт [84]. Они относительно устойчивы ко многим наиболее распространенным дезинфектантам. Эфир, дезоксихолат, и различные детергенты не оказывают влияния на энтеровирусы, так как в их составе отсутствует липидный слой, 70% этиловый спирт оказывает влияние на вирус только при экспозиции не менее 3-х часов. 10% растворы лизола и фенола также оказывают инактивирующее действие на энтеровирус при экспозиции 3-4 часа. Перекись водорода в дозе 6,8 мг/л инактивирует энтеровирусы в воде за 30 мин [84]. К быстрой инаktivации ведет обработка 0,3% формальдегидом, 0,1 N HCl или свободным остаточным хлором в концентрации 0,3-0,5 мг/л, однако присутствие органических веществ может оказать защитное действие даже в хлорированной воде [16,81].

Энтеровирусы довольно быстро инактивируются при ультрафиолетовом облучении, также быстро инактивирует их раствор йода [85]. При высушивании значительно снижается титр вируса [84].

#### 1.1.7. Клинические проявления энтеровирусной инфекции

Энтеровирусы распространены повсеместно как у человека, так и у животных и вызывают широкий спектр заболеваний. Причем нет возможности привязать определенный тип к вызываемому заболеванию. Разные типы вызывают схожие заболевания, а одни и те же типы могут вызывать большой спектр различных симптомов. Заболевания, вызванные НПЭВ в странах с умеренным климатом, в том числе в России, имеют ярко выраженную осенне-весеннюю сезонность [86]. Более 20 клинических симптомов ассоциируют с энтеровирусами человека: от легких заболеваний, включая недифференцированную лихорадку, конъюнктивит и экзантему, до более тяжелых заболеваний, таких как пневмония, менингит, миокардит, перикардит, энцефалит и паралич.

Энтеровирусы являются возбудителями заболеваний у многих животных: приматы, свиньи, мыши, крупный рогатый скот. Источником вирусной инфекции может являться как больной человек, так и инфекционный носитель без видимых клинических симптомов заболевания. Вирус выделяется из носоглотки и кишечного тракта. Он имеет несколько путей передачи: фекально-оральный, воздушно-капельный, трансплацентарный [87,88]. В случае энтеровирусов, передающихся фекально-оральным путем, таких как полиовирус, вирусные частицы инфицируют слизистую ротоглотки и кишечника. Вирус эффективно размножается в кишечнике и способен выделяться с калом до нескольких недель. Из пищеварительного тракта энтеровирус достигает шейных и мезентериальных лимфатических узлов, а может вызывать первичную вирусемию. Инфекция обычно заканчивается на этой стадии, и поэтому большинство энтеровирусных инфекций протекает бессимптомно [89]. Однако в зависимости от его тропизма вирус может достигать и других тканей и органов, что приводит к вторичной вирусемии и возможному развитию различных симптомов [54,91,92].

После ликвидации полиовируса дикого типа 2 и типа 3 в большинстве регионов мира, EV-A71 стал наиболее значимым нейротропным энтеровирусом [16]. Все чаще сообщается, что EV-A71 вызывает серьезные заболевания, особенно у маленьких детей в Азии [92]. Этот вирус вызывает экзантему по типу «рука-нога-рот» (hand, foot and mouth disease, HFMD), а в редких случаях - тяжелые и фатальные неврологические осложнения, включая энцефалит ствола головного мозга [93,94]. Основной причиной крупномасштабных вспышек HFMD во многих регионах мира являются EV-A71 и CV-A16 [95,96]. Следует отметить, что инфекция, вызванная CV-A16, обычно не ведет к развитию неврологических симптомов, а завершается на стадии

поражения кожных покровов рук, ног, слизистой рта, герпангиной. EV-A71, кроме этого, может вызывать неврологические заболевания, такие как асептический менингит, острый вялый паралич, энцефалит у младенцев и детей младшего возраста [96,97].

ВВБС является близким родственником человеческого энтеровируса вида В, вируса CV-B5 [8,10]. ВВБС является этиологическим агентом серьезного ветеринарного заболевания. Несколько исследований пытались объяснить его происхождение. Однако несколько ключевых вопросов, в том числе точное биологическое происхождение вируса, точное место и время его происхождения пока остаются невыясненными [98].

## 1.2. Рекомбинация энтеровирусов

Генетическая рекомбинация - вид эволюционного изменения генетической информации, широко распространенное явление как внутри (внутритипная рекомбинация), так и между (межтипная рекомбинация) типами энтеровирусов. События рекомбинации часто предшествуют появлению новых эволюционных ветвей энтеровирусов [99–104]. Рекомбинация связана с появлением большинства патогенных циркулирующих полиовирусов вакцинного происхождения, которые вызывали многочисленные вспышки паралитического полиомиелита во всем мире [54,105]. Способность энтеровирусов к рекомбинации, позволяет им обмениваться фрагментами генома друг с другом, и из двух неполноценных полинуклеотидных последовательностей может быть составлен функциональный ген [56,103,106].

Вирусная полимеразы обладает низкой точностью, что приводит к большому числу ошибок, и приводит к образованию новых вариантов. Однако не все из образовавшихся вариантов вирусов жизнеспособны и могут пройти естественный отбор. Рекомбинация сформировала генетическое разнообразие РНК-содержащих вирусов, в частности энтеровирусов, которые часто демонстрируют мозаичность генома [1,100,107–110].

Отсутствие корректирующей активности 3D-полимеразы приводит к высокой скорости мутаций и генерации популяции родственных последовательностей [111–115]. В организме образуется множество мутантных форм из-за короткого жизненного цикла вируса и высокой продуктивности. Такие гетерогенные и динамические популяции называют «квазивидами» [111,116,117]. Квазивиды представляют собой не просто набор разных вариантов одного вируса, а эволюционирующую единицу [118]. Размер этого пула мутантов имеет решающее значение для адаптации, распространения и патогенеза вируса [119–123]. Гетерогенные популяции могут включать множество плохо приспособленных или даже «мертвых» геномов [124–126]. Неточность репликации может иметь особое значение для приспособленности, если речь идет о небольших вирусных популяциях и различного рода эффектов «бутылочного горлышка», с которыми могут столкнуться вирусы. В частности, этот эффект возникает, когда вирусу

приходится преодолевать различные барьеры, будь то внутри хозяина (например, гематоэнцефалический барьер) или между хозяевами [127]. Если после преодоления таких барьеров инфекция инициируется малоприспособленным инфекционным геномом, вновь созданная вирусная популяция может быть нежизнеспособна и зайти в эволюционный тупик (явление, известное как храповик Мюллера) [111,128,129].

Рекомбинация геномной РНК (процесс, во время которого фрагменты генома, принадлежащие разным молекулам РНК, объединяются в один геном) является важной движущей силой в эволюции РНК-вирусов [54]. Рекомбинацию классифицируют как гомологичную и негомологичную. Гомологичные рекомбинанты имеют ту же структуру, что и родительские вирусы, тогда как негомологичные рекомбинанты имеют aberrantную структуру, имеющую делеции, вставки или дубликации (Рисунок 6) [54,105].

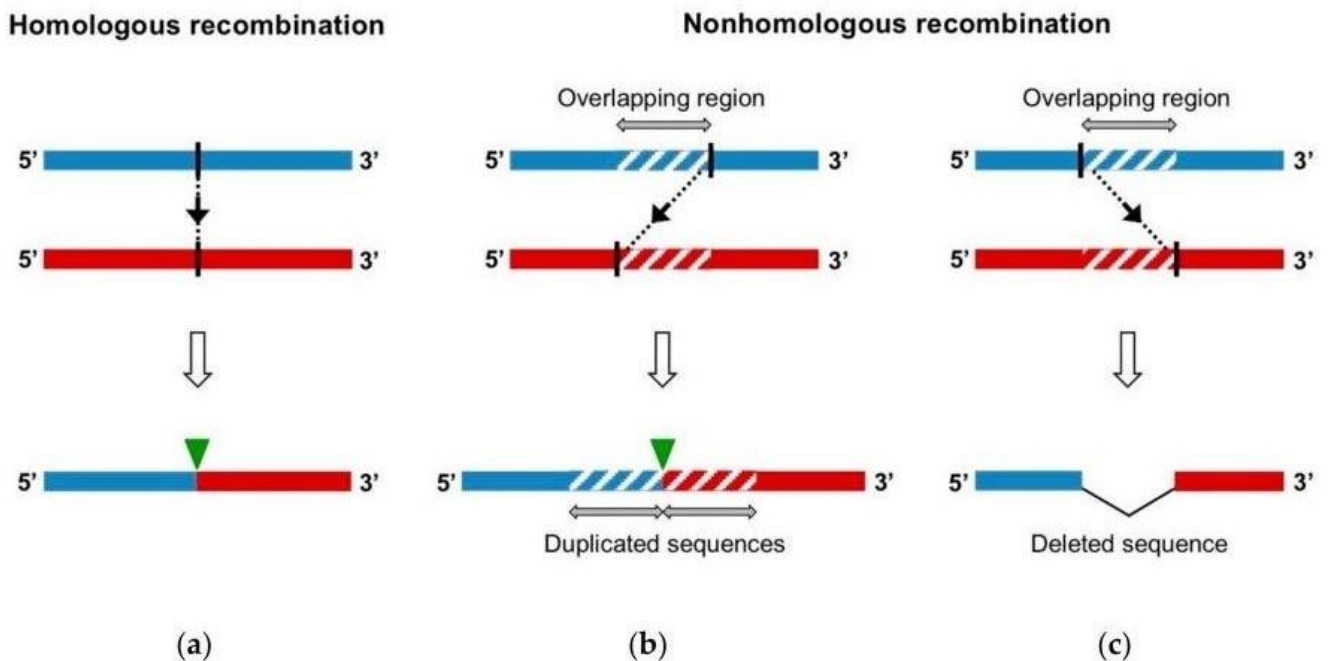


Рисунок 6 – Гомологичные и негомологичные рекомбинантные геномы. (a) Гомологичная рекомбинация происходит в одном и том же сайте в обоих родительских геномах, а полученный рекомбинант имеет ту же геномную структуру, что и родительские вирусы. (b) и (c) Негомологичная рекомбинация происходит в разных сайтах двух родительских геномов. (b) Вокруг сайта рекомбинации создается дубликация гомологичных последовательностей (заштрихована). (c) Происходит делеция геномной последовательности [54]

В зависимости от происхождения родительских цепей можно различать внутригеномную рекомбинацию, при которой рекомбинирующие молекулы принадлежат одному и тому же вирусу, и межгеномную рекомбинацию, при которой фрагменты имеют разное происхождение [54,130].

Рекомбинация РНК позволяет вирусам обмениваться генетической информацией и включать фрагменты вирусной РНК в новые геномы энтеровирусов. Таким образом,

рекомбинация способствует сочетанию полезных мутаций в одном и том же геноме, что приводит к созданию лучше приспособленных к окружающей среде вариантов [54,131]. Было показано, что рекомбинация РНК не только является источником генетического разнообразия, но и является восстанавливающим механизмом, необходимым для поддержания целостности вирусного генома [132].

В качестве адаптационного механизма, рекомбинация РНК сыграла важную роль в разнообразии и эволюции РНК-вирусов и привела к появлению новых типов [133–135]. Также, рекомбинация РНК связана с межвидовой передачей и расширением круга вирусных хозяев [136–140]. Рекомбинация РНК может привести к увеличению патогенности и приспособленности вирусов [141,142].

Два разных механизма могут привести к образованию рекомбинантной молекулы РНК в РНК-вирусах: репликативный механизм, описанный как «модель выбора копий» (copy-choice model), или «механизм переключения шаблонов» (template-switching mechanism), и нерепликативный по механизму воссоединение разрывов (Рисунок 7). Оба механизма были впервые описаны для полиовируса [143,144].

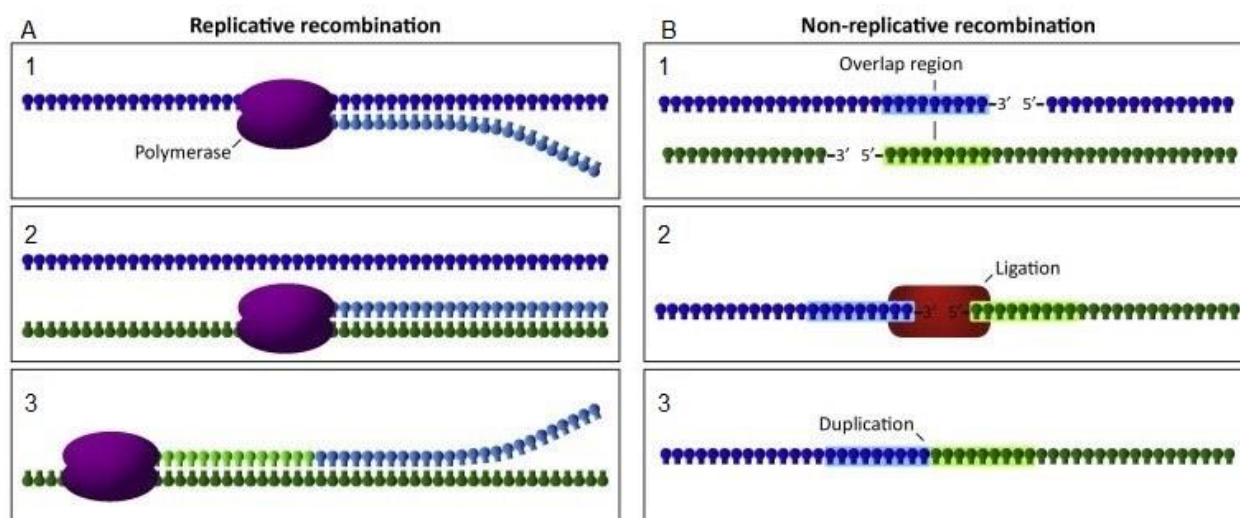


Рисунок 7 – Механизмы репликативной и нерепликативной рекомбинации РНК.

А –репликативный механизм «модель выбора копий»;

В – нерепликативный механизм воссоединение разрывов [145]

Репликативная модель рекомбинации энтеровирусов включает следующие этапы:

- остановка репликации РНК;
- диссоциация полимеразного комплекса с первой молекулой РНК – матрицы;
- опознавание репликационным комплексом гомологичного участка на другой молекуле РНК;
- продолжение репликации [42,143,144,146].

Репликативная модель утверждает, что вновь синтезированная цепь нуклеиновой кислоты может диссоциировать от матрицы донора РНК во время репликации и взаимодействовать с другой матрицей, акцепторной РНК или с другим участком той же матрицы. Результатом этого взаимодействия является перенос репликативного комплекса на новую матрицу, где возобновляется синтез РНК, в результате чего образуется гибридная геномная молекула, содержащая генетическую информацию из двух разных источников (Рисунок 7) [144]. Переключение матрицы может давать как гомологичные, так и негомологичные рекомбинанты.

Альтернативной гипотезой является нерепликативная рекомбинация [143]. Вирусные геномы, попадая в цитоплазму клетки, могут подвергаться случайным разрывам эндонуклеазами, рибозимами или механическим воздействием [147]. При таком воздействии образуются геномные фрагменты с 3'-Р или 5'-ОН-концами, которые могут самолигироваться или соединяться с помощью лигаз клетки [143]. В результате образуется большое количество негомологичных рекомбинантов, большинство из которых нежизнеспособны и только единичные варианты могут быть способны к трансляции функциональных белков и репликации в клетке (Рисунок 7) [145].

Общей чертой жизнеспособных рекомбинантных геномов энтеровирусов является то, что сайты рекомбинации, по-видимому, не были распределены случайным образом в области генома, а были расположены в «горячих точках» рекомбинации. Экспериментальные исследования межтиповой рекомбинации между геномами энтеровирусов позволили определить шесть горячих точек рекомбинации во всем геноме энтеровирусов: три в 5'-НТО и три в неструктурной области (Рисунок 8) [148–150]. Сайты негомологичной рекомбинации были обнаружены исключительно в последовательностях «горячих точек», тогда как сайты гомологичной рекомбинации также могли быть обнаружены в других местах генома энтеровирусов [151].

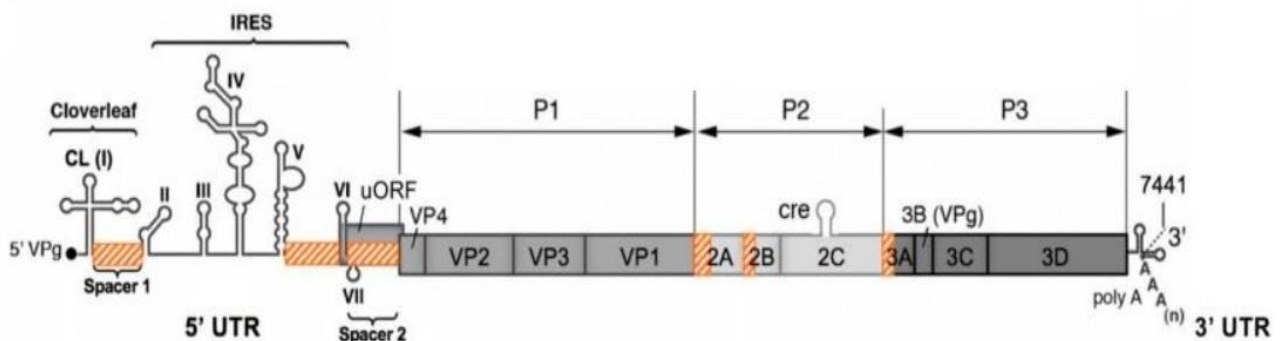


Рисунок 8 – Схематическое изображение молекулы геномной РНК энтеровируса. Заштрихованными оранжевыми прямоугольниками указаны шесть предполагаемых горячих точек рекомбинации [54]

На Рисунке 8 представлено расположение шести горячих точек рекомбинации. В 5' НТО были идентифицированы три горячие точки рекомбинации: между CL (структура клеверного листа) и IRES, линкерная последовательность между доменами IRES dV и dVI и участок dVII, связывающий IRES с ORF (открытая рамка считывания), кодирующей полипротеин [54,149]. Три другие точки рекомбинации были идентифицированы в неструктурной области, каждая из которых преимущественно состоит из негомологичных сайтов рекомбинации и расположена на стыке двух вирусных генов: VP1-2A, 2A-2B и 2C-3A [54,150].

### 1.3. Байесовский подход в филогенетике

Филогенетический анализ направлен на восстановление эволюционных событий, а также на изучение дивергенции последовательностей участков генома вирусов. Этот метод основан на сравнении последовательностей участков генома [152–155]. Вирусный геном включает в себя как консервативные участки, где практически не наблюдаются мутации, так и переменные участки, в которых количество замен существенно выше. Данный метод учитывает только несинонимические замены. К сожалению, количество синонимических замен отследить практически невозможно. При анализе большого количества изолятов, можно определить группы вирусов, имеющие общего предшественника и степень их родства между собой [5,156–159].

Байесовский подход в филогенетике, основан на элементарной теории вероятности и позволяет получить наиболее достоверное филогенетическое дерево. Байесовская филогенетика уделяет особое внимание оценке распределения вероятностей по интересующим параметрам, включая топологию филогенетического дерева и время расхождения общего предка (to most recent common ancestor, tMRCA) [160].

Гипотеза о эволюционных молекулярных часах была выдвинута в 1960-х годах, с тех пор было проведено множество исследований и получены важные результаты [161,162]. Молекулярные часы моделируют эволюцию последовательностей, так что длину ветвей филогенетического дерева можно сопоставить с генетическими расстояниями и установить число замен на сайт в год (при включении в анализ референсных последовательностей с максимально отдаленным годом выделения) [58,163].

Ранее возможности байесовского филогенетического анализа предусматривали строгие (глобальные) молекулярные часы, где скорость эволюции была одинакова в каждой ветви [164,165]. Строгие часы используют при анализе внутривидовых последовательностей, где ожидается одинаковая скорость эволюции между ветвями [156]. Введение расслабленных молекулярных часов позволило оценить филогению и время расхождения общего предка при

наличии неоднородной скорости эволюции разных кластеров [166,167]. С тех пор модель расслабленных часов широко применяется для исследований [168–170].

На практике было предложено много альтернативных моделей расслабленных часов [160,166,171]. Они различаются по многим параметрам: одни описывают скорость как непрерывный процесс, другие - что скорость меняется только во время видообразования, а третьи не описывают сам процесс скорости, а присваивают каждой ветви параметр средней скорости [166,170,172]. Эволюционные модели также можно различить по своей динамике: коэффициенты замещения могут быть как автокоррелированными, так и нет [172,173]. Также, для определения времени расхождения предков были предложены различные априорные распределения вероятностей, такие как равномерное, Дирихле и др. [159,166,172,174].

Одной из популярных моделей филогенетического анализа, является модель, предложенная Шапиро SRD06 [175]. Данная модель основана на комбинации моделей нуклеотидных замен НКУ (Hasegawa-Kishino-Yano), которая различает скорости транзиционных и трансверсионных замен, а также модели, учитывающей разную скорость нуклеотидных замен в трех позициях кодона и гетерогенность скорости гамма-распределения, что делает ее одной из наиболее реалистичных моделей эволюции кодирующих последовательностей [175,176]. Этот метод оценивает возраст или дату выделения отдельных последовательностей в рамках байесовского метода Монте-Карло для марковских цепей (Markov chain Monte Carlo, МСМС) [177]. Данная модель замещения предоставляется программным пакетом BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) [178,179]. BEAST использует расслабленные некоррелированные логнормальные часы, позволяет указать дату выделения для каждой последовательности исследуемых образцов и использует эту информацию для построения временной шкалы. Модели, реализованные в BEAST, фиксируют внешние узлы дерева на указанные даты, а затем производят выборку времени внутренних узлов дерева из их апостериорного распределения вероятностей с использованием МСМС [180]. Длина каждой ветви в единицах времени сопоставляется с ожидаемым количеством замен на сайт в год с использованием вектора скоростей молекулярной эволюции [163, 179]. В рамках этих моделей BEAST может одновременно делать выводы о топологии дерева, времени внутренних узлов и скорости эволюции [181]. Всем этим параметрам присваивается одно из множества возможных априорных распределений вероятностей. Затем выборка МСМС используется для получения оценки предельных апостериорных распределений вероятностей для любых интересующих параметров [182].



#### 1.4. Рекомбинация у неполиомиелитных энтеровирусов

Рекомбинация способствует эволюционному разнообразию энтеровирусов, и является одним из механизмов приобретения новых фенотипических признаков. При репликации вирусов разные области генома энтеровирусов играют разные роли и эволюционные события у них могут следовать по-разному. Четыре вида энтеровирусов (А, В, С, D), филогенетически сильно различаются в кодирующей области генома, но тем временем в области генома 5'-НТО делятся только на два кластера [56]. В один входят энтеровирусы вида А и В, в другой кластер энтеровирусы вида С и D, вдобавок, внутри этих групп представители видов «перетасованы» между собой (Рисунок 9). Это объясняется рекомбинацией, которая происходила между вирусами, после разделения видов [56,111,183]. В результате этих событий два из четырех предыдущих вариантов последовательностей 5'-НТО энтеровирусов были вытеснены (Рисунок 9) [109,149,184].

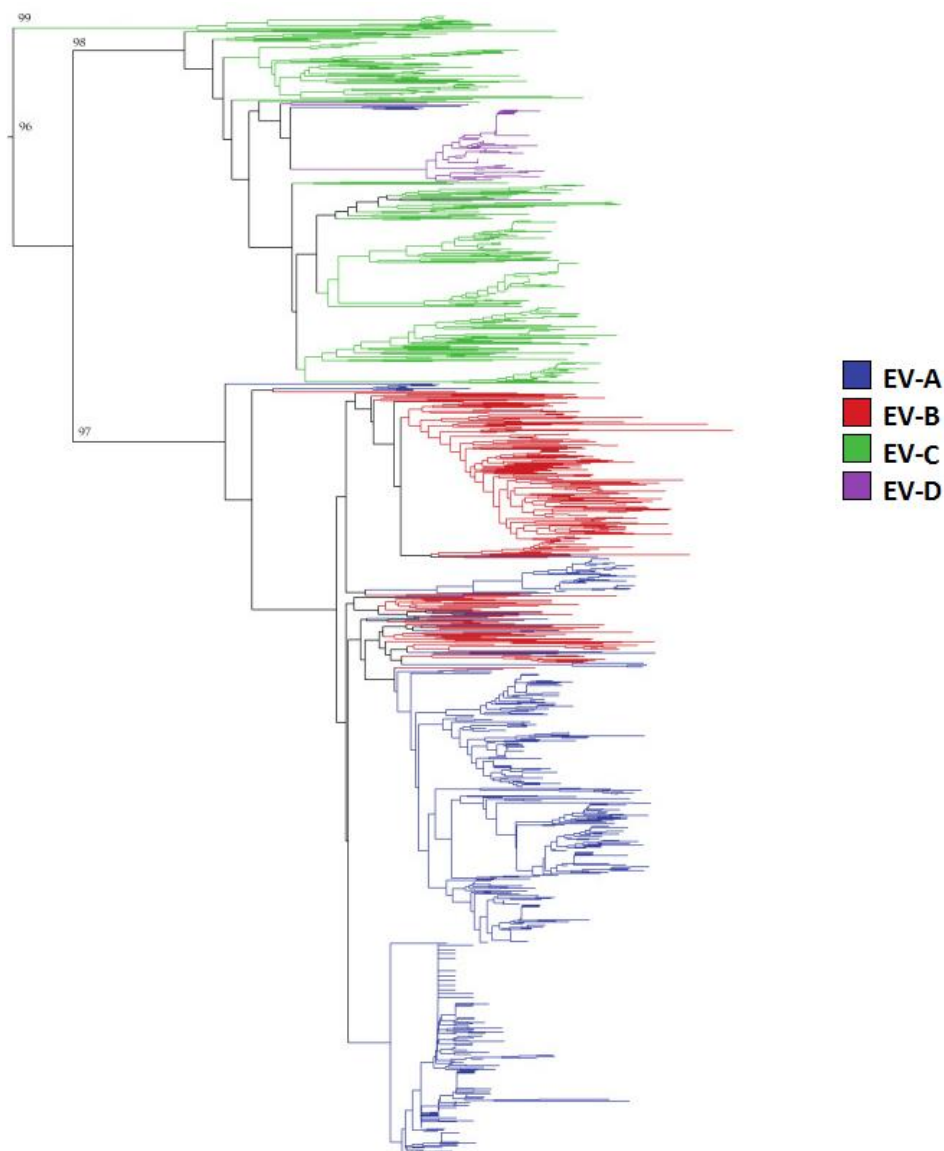


Рисунок 9 – Филогенетическое дерево 5'-НТО энтеровирусов вида А, В, С и D. Цвета соответствуют каждому виду. Для основных кластеров указано значение бутстреп. Дерево адаптировано для представления [184]

Сравнительный анализ частоты и характера рекомбинации энтеровирусов разных видов показал, что представители энтеровирусов вида А и вида В имеют разную частоту рекомбинационных событий. Лишь 10% энтеровирусов вида А, выделенных с интервалом в 1 год, были рекомбинантами в области генома 3D, а с интервалом выделения до 10 лет - около 30%. Энтеровирусы вида В показали более частые рекомбинационные события [1,185]. Около 40% изолятов, выделенных в один год, оказались рекомбинантами друг относительно друга в области генома 3D (Рисунок 10), тогда как с интервалом выделения более 3 лет, практически все энтеровирусы вида В, имели разную последовательность 3D.

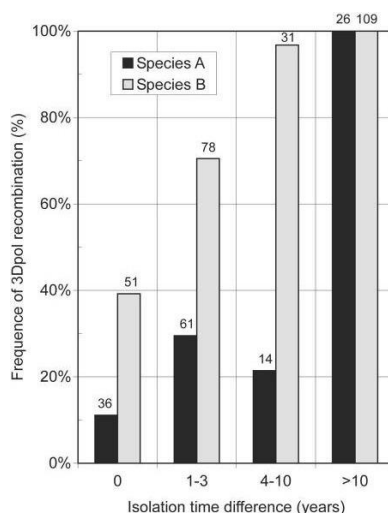


Рисунок 10 – Временная шкала рекомбинации 3Dpol энтеровирусов вида А и В. Частоту рекомбинации участков генома 3Dpol (ось у) сравнивали со временем, прошедшим между сбором или выделением изолятов энтеровирусов [1]

В то же время было показано, что все без исключения исследуемые энтеровирусы вида В являются рекомбинантами относительно прототипных штаммов [185]. Все изученные штаммы энтеровирусов вида В группировались соответственно их типу в области генома VP1, а в области генома 3D филогенетическое группирование не соответствовало кластеризации в структурной области генома. В проделанной работе ни один из изученных штаммов вирусов в области генома 3D не группировался со своим прототипным штаммом (Рисунок 11) [42].

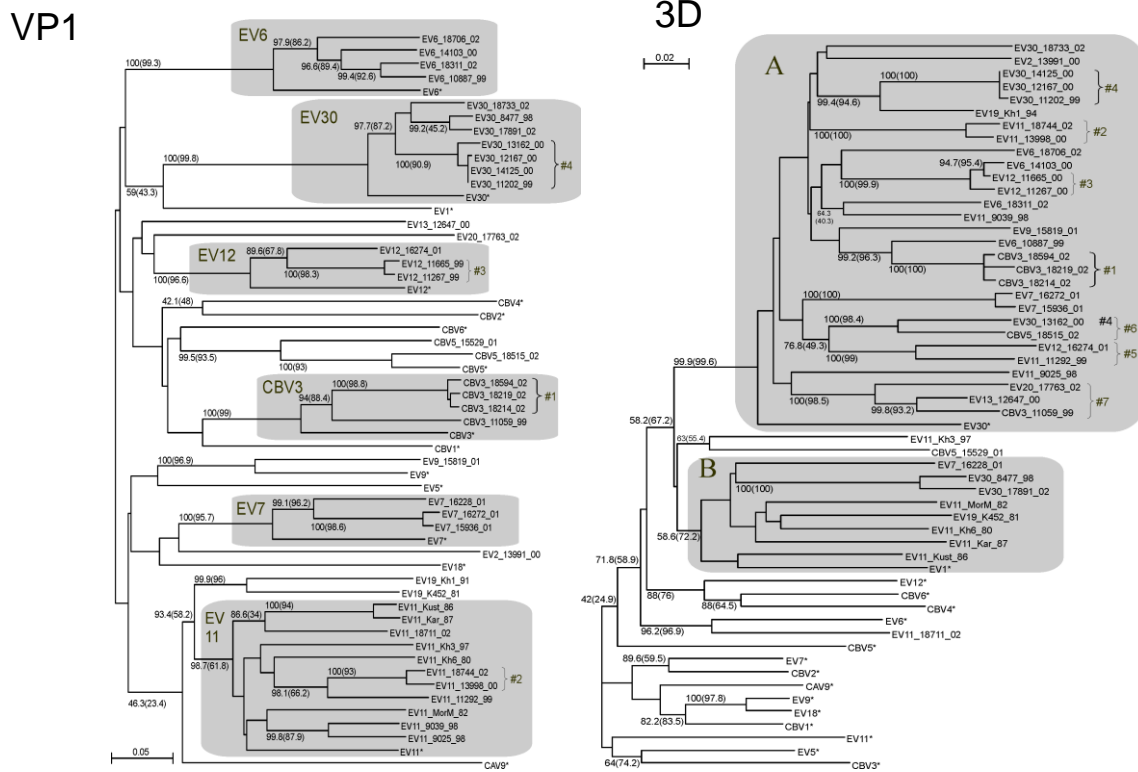


Рисунок 11 – Филогенетические деревья для участков генома VP1 и 3D энтеровирусов вида В [5]

По этим данным можно наблюдать временные закономерности изменения отдельных областей генома [5]. Также было показано, что все изученные штаммы оказались мозаичными рекомбинантами относительно прототипных штаммов энтеровирусов вида В и друг относительно друга [187]. Все вирусы были филогенетически схожи со своими прототипными штаммами только в структурной области генома, кодирующей белок VP1 (Рисунок 12) [42].

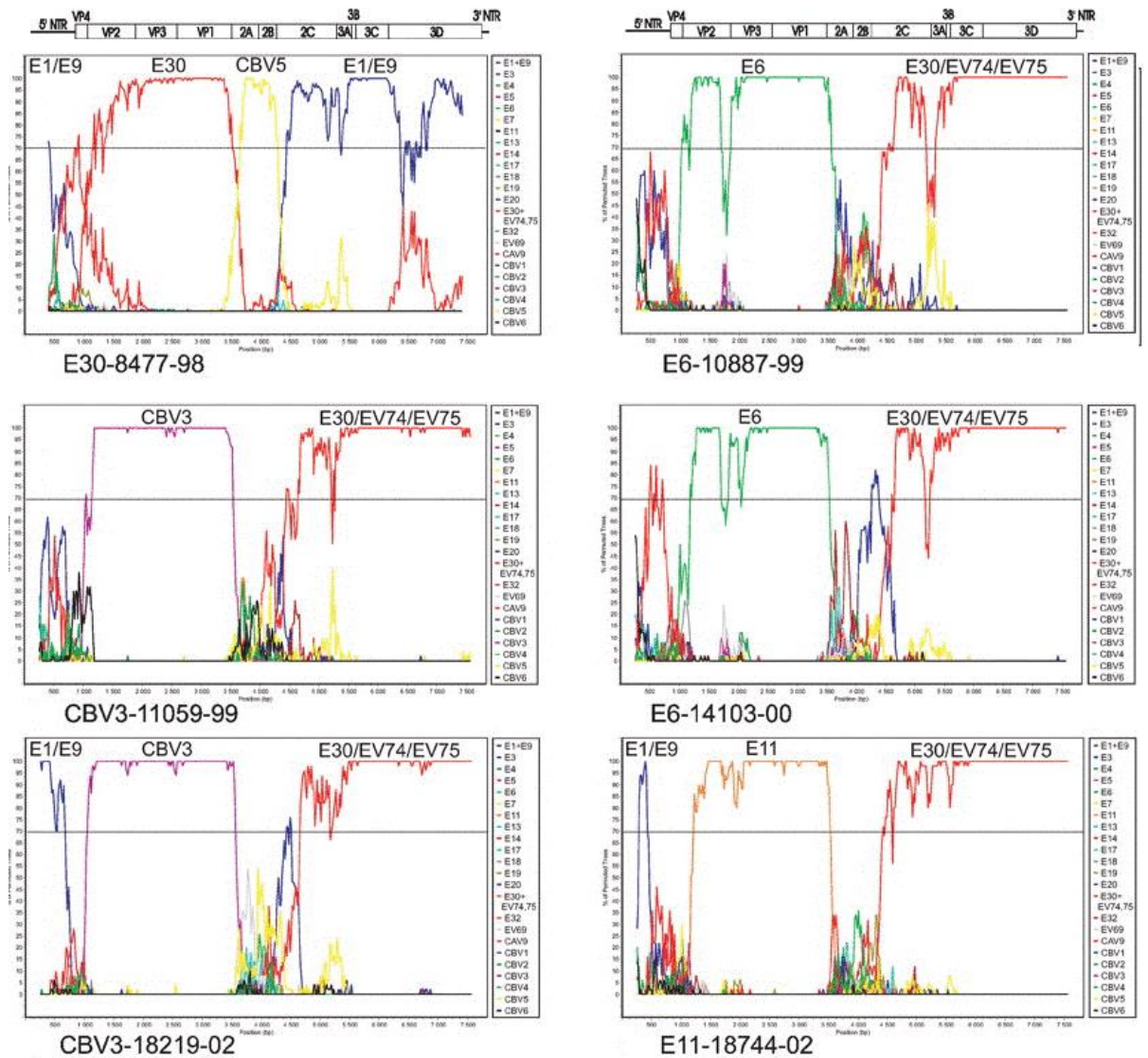


Рисунок 12 – График сходства сравнений штаммов энтеровирусов вида В с их прототипными штаммами. Ось X указывает позицию в геноме, ось Y - % вероятности образования кластера на филогенетическом дереве. Сверху показано схематическое изображение генома энтеровирусов [186]

Во многих работах были показаны признаки более частых рекомбинационных событий фрагментов генома энтеровирусов вида В, чем вида А, не только между областями генома VP1 и 3D, но также между VP1 и VP4. При филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей участка генома, кодирующей белок VP1 сформировались кластеры согласно их типам, но при этом в областях генома 3D и VP4 исследуемые вирусы распределялись неравномерно (Рисунок 13).

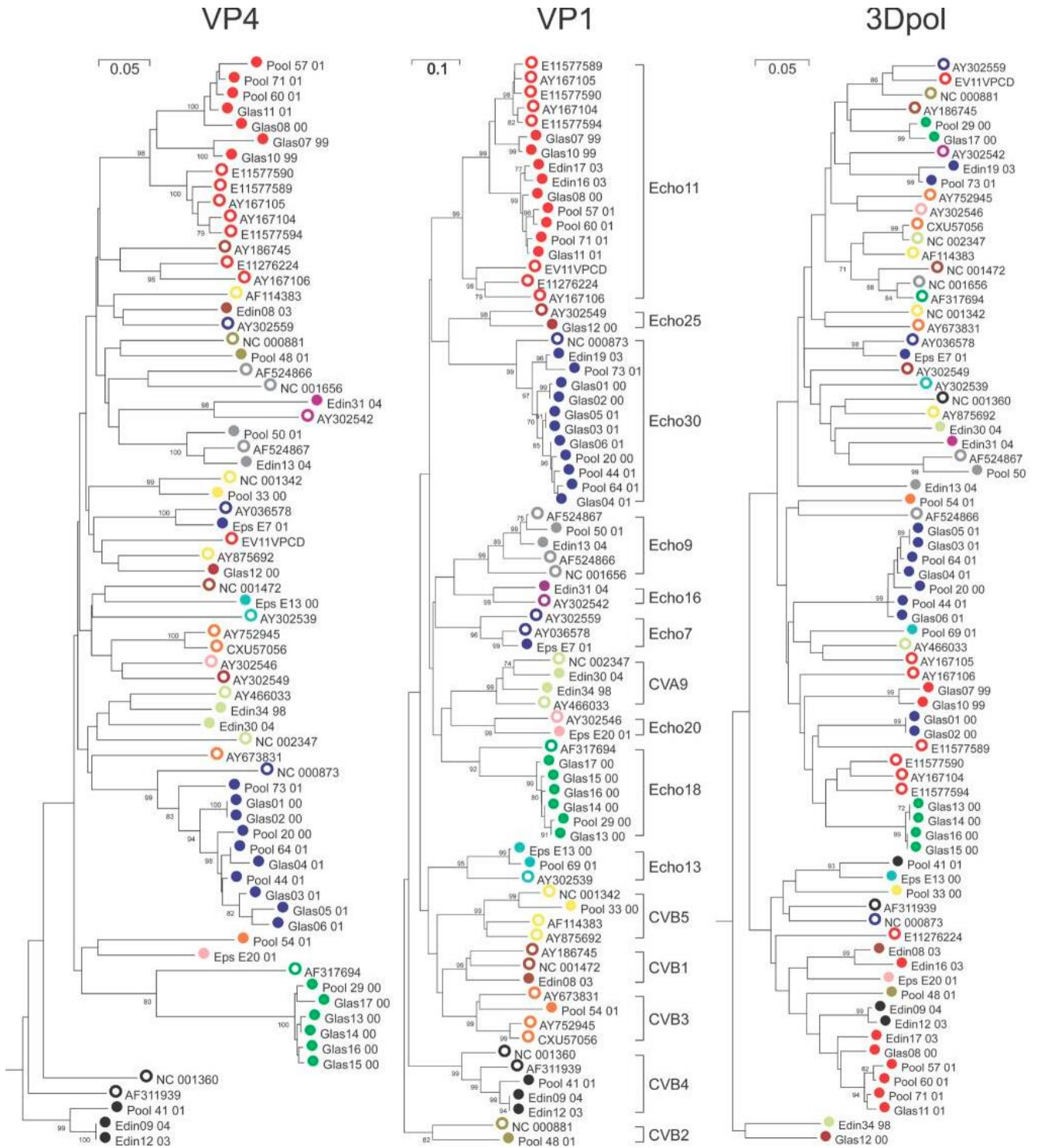


Рисунок 13 – Филогенетический анализ вариантов вида В в областях VP4, VP1 и 3D [1]

Для энтеровирусов вида А филогенетическое группирование в соответствии с их типами, которое наблюдается для участка генома, кодирующего белок VP1, сохранилось в области генома VP4 и 3D, за исключением отдельных представителей группы Коксаки, таких как CV-A5, CV-A10 в филогенетическом дереве участка неструктурной области генома 3D (Рисунок 14).

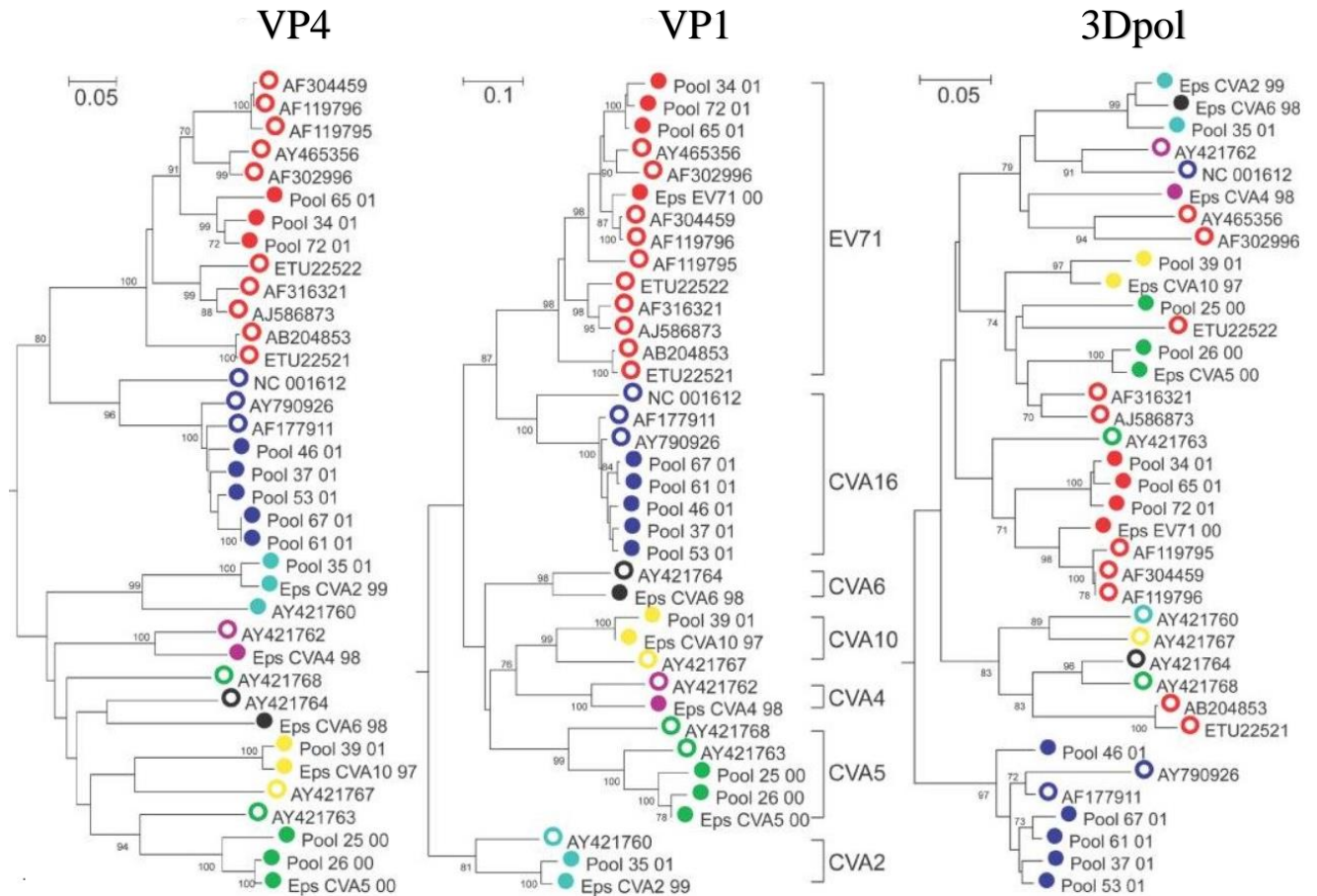


Рисунок 14 – Филогенетический анализ последовательностей энтеровирусов вида А участка генома VP4 (позиции с 744 по 962), VP1 (позиции с 3046 по 3335) и 3D (позиции с 6968 по 7151) [1]

Однако в случае выборок CV-A6 и CV-A2, которые были генетически различны в области генома, кодирующей структурный белок VP1, все три исследуемых образца оказались группированы вместе на филогенетическом дереве участка генома, кодирующей белок 3D, что свидетельствует о рекомбинационных событиях.

Анализ географических и временных аспектов рекомбинации энтеровирусов вида В типов E9 и E11 показал, что последовательности, отнесенные к конкретным рекомбинантным формам, группируются в соответствии с их паттернами области генома 3D [1]. Была определена взаимосвязь между дивергенцией последовательности VP1 (измеренной по парным расстояниям) и вероятностью рекомбинации. Для каждого попарного сравнения изолятов, независимо от того, принадлежали ли два варианта к одной или разным группам 3D, регистрировали их расхождение по VP1, их географическое разделение и разницу в датах выделения. Как для E9, так и для E11 доля сравнений, в которых изоляты имели разные группы 3D, увеличивалась с увеличением дивергенции VP1. Исходя из этого, были рассчитаны периоды полужизни рекомбинантных форм E9 и E11 путем определения среднего расхождения последовательности в VP1 при 50% пороге

частоты рекомбинации (0,015 и 0,094 для E9 и E11 соответственно). Используя скорость эволюции, определенную для VP1 (E9 -  $5,8 \cdot 10^{-3}$ ; E11 -  $4,8 \cdot 10^{-3}$ ), было рассчитано хронологическое время достижения этой степени расхождения. Период полувыведения рекомбинантных форм для E9 составлял 1,3 года, тогда как период полувыведения E11 был намного больше (9,8 лет), при этом период полувыведения рекомбинантных форм E30 (3,1 года) был промежуточным между этими двумя значениями (Рисунок 15) [187].

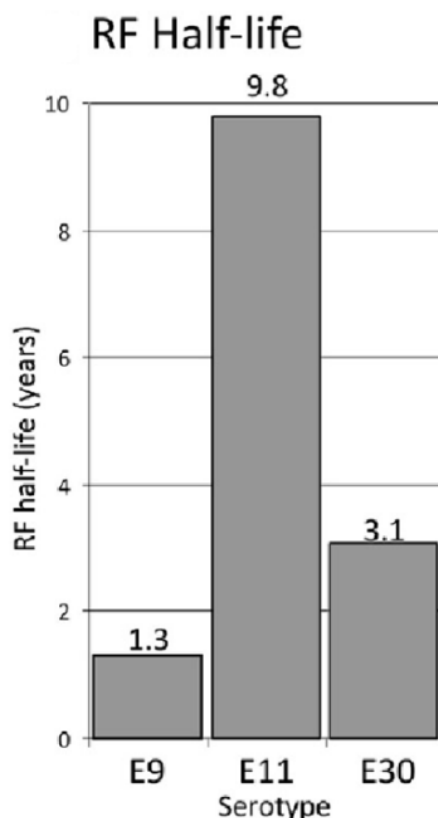


Рисунок 15 – Сравнение средних периодов полураспада рекомбинантных форм E9, E11, E30. Ось X указывает тип энтеровирусов вида B, ось Y - % время жизни рекомбинантных форм [99]

В недавней работе по изучению рекомбинации энтеровирусов вида A, был проведен анализ полных геномных последовательностей 15 типов. Исследование идентичности последовательностей проводили с референсным штаммом EV-A71 BrCr [163,188]. В исследование вошли 10 типов Коксаки вирусов и 5 «новых» типов энтеровирусов. Паттерны сходства различались в разных областях генома. Часть генома, кодирующая капсидные белки, показала примерно одинаковую дивергенцию в исследуемых типах. В то время как в области генома 5'НТО и неструктурной области генома типы энтеровируса разделились на 3 кластера (Рисунок 16).

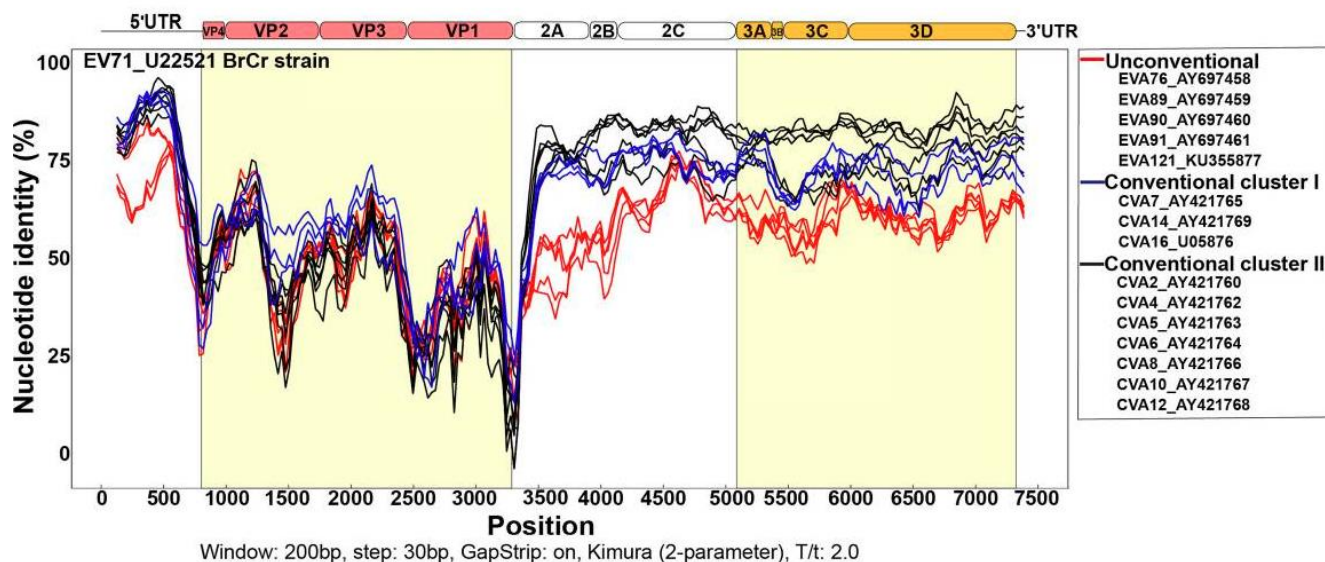


Рисунок 16 – График сходства полных геномных последовательностей разных типов энтеровирусов вида А с использованием скользящего окна из 250 нуклеотидов, перемещающихся с шагом в 30 нуклеотидов. Штамм EV-A71 BrCr использовали в качестве референсной последовательности. Ось X указывает позицию в геноме, ось Y – % нуклеотидной идентичности. Сверху показано схематическое изображение генома энтеровирусов [188]

Таким образом, данные показывают, что генетическая сегрегация между «обычными» и «новыми» типами энтеровирусов вида А (EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A120) имеет большие различия в последовательностях некапсидных областей. Эти данные подразумевают, что «новые» и «обычные» типы энтеровирусов вида А, вероятно, циркулируют у разных видов хозяев. Было предположено, что человек изначально не являлся естественным носителем «новых» типов энтеровирусов, и это также может объяснить, почему существует рекомбинационный барьер между обычными и «новыми» типами энтеровирусов вида А.

### 1.5. Межвидовая передача энтеровирусов

Учитывая доказательства того, что энтеровирусы человека могут часто встречаться у других видов млекопитающих, вполне возможно, что энтеровирусы, которые естественным образом циркулируют в популяциях животных, также могут инфицировать популяции людей. Имея множество генотипов, высокую скорость мутаций и частую рекомбинацию, энтеровирусы обладают значительным потенциалом межвидовой инфекции [189]. Обмен частями генома из разных родительских последовательностей может привести к более высокому генетическому разнообразию и иногда способствовать преодолению барьера вида вирус-хозяин [7,103]. Так, например, в Турции при исследовании 3020 образцов сыворотки крови восьми видов животных (человека, крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей и собак) из разных регионов, было показано, что у 30% здоровых людей были обнаружены антитела к бычьему энтеровирусу типа 1 (BEV-1). После крупного рогатого скота (65%) у людей был один из самых высоких



коэффициентов серопозитивности на BEV-1 по сравнению с другими видами, которые дали положительные результаты (овцы – 33%, козы – 27%, лошади – 13%, собаки – 3%) [190]. Авторы предполагают, что возможной причиной заражения человека BEV-1 может быть контакт с инфицированными животными или зараженными фекалиями крупного рогатого скота.

Позже были зарегистрированы три вспышки респираторных заболеваний, произошедших одновременно среди популяции горилл и людей. Отмечалось, что симптомы проявлялись у людей до того, как первые признаки были замечены у горилл. Во время первой вспышки, один из 16 образцов, взятых у людей, был положительный на энтеровирус. Типирование этого вируса показало, что образец на 89 % идентичен ВВБС и на 90% EV-A71. Во время второй вспышки, один из 7 клинических образцов, взятых у людей, дал положительный результат на энтеровирус с 90% идентичностью к агенту обезьян 5. При третьей вспышке, 12 из 25 образцов фекалий горилл, были положительными на энтеровирус. Последовательности этих положительных образцов были идентичны последовательностям энтеровирусов человека, обнаруженной при первой вспышке, и также с высоким процентом схожести совпали как к ВВБС, так и к EV-A71 [31,191,192].

Первые сообщения о ВБС в Советском Союзе относятся к 1972 г. Эпизоотия возникла в Одесской области, одном из крупных портов Советского Союза [193,194]. Выделенный штамм O72 (Одесса-1972) был серологически типирован как ВВБС с морфологическими, физическими и химическими свойствами, сходными со штаммами, циркулировавшими в то время во всем мире [193]. В 1975 г. в 22 хозяйствах Тамбовской области была зарегистрирована еще одна вспышка 24488 случаев везикулярной болезни свиней. Согласно существующим рекомендациям по расследованию вспышек везикулярной болезни свиней, изолят проверяли на наличие ВВБС, вируса ящура и вируса везикулярной экзантемы свиней. Ни один из этих агентов не был обнаружен. Вирус был идентифицирован как энтеровирус по физическим свойствам и электронной микроскопии. Однако вирус не мог быть нейтрализован сывороткой к классическому вирусу ВВБС, и поэтому был назван вирусом ВВБС серотипа 2, в то время как классический вирус ВВБС был назван серотипом 1 вируса свиней [195].

Было установлено, что вирус везикулярной болезни свиней возник из человеческого вируса CV-B5, который передался свиньям между 1945 и 1965 годами путем рекомбинации [7]. Благодаря филогенетическому анализу, недавно было выдвинуто предположение, что ВВБС мог возникнуть в результате одного рекомбинантного события [30].

Внутри типовые, меж типовые и межвидовые рекомбинации были описаны внутри и между четырьмя видами энтеровирусов человека [5,110,196]. Лишь в нескольких исследованиях сообщается о возможных событиях внутривидовой рекомбинации между энтеровирусами обезьян или крупного рогатого скота [157,197]. Подавляющее большинство известных в

настоящее время рекомбинантов энтеровирусов также были внутривидовыми рекомбинантами, и сообщалось лишь о нескольких межвидовых примерах [103,110,198–201]. Существует множество доказательств переноса энтеровируса между отдаленно родственными видами хозяев. Например, энтеровирус F (ранее энтеровирус 2) был обнаружен у опоссума, а изолят энтеровируса E (ранее бычий энтеровирус 1) был обнаружен у дельфина и у приматов [202–204]. Рекомбинация различных видов энтеровирусов может стимулировать возникновение новых видов. Был охарактеризован новый межвидовой рекомбинантный энтеровирус из образцов фекалий овец, который в области генома 5'-НТО был идентичен с BEV, но в других областях был наиболее близок с PEV-B [201].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Штаммы вирусов и культуры клеток, использованные в работе

#### 2.1.1. Штаммы энтеровирусов вида А

Для определения филогенетических взаимоотношений энтеровирусного генома, нами были отобраны 80 образцов энтеровирусов вида А, выделенных от больных с острым вялым параличом, серозным менингитом, с симптомами энтеровирусной инфекции (лихорадка, поражение ЖКТ, ЦНС, сердечно-сосудистой системы, мышечной системы, почек, печени и др.) и от контактировавших с больными людьми (Таблица 3). Штаммы были выделены в различных городах России и странах СНГ в 2003-2011 годах в рамках программы надзора за полиомиелитом, и любезно предоставлены из коллекции лаборатории по надзору за полиомиелитом и другими энтеровирусными инфекциями с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Согласно российским правилам, для проведения анонимных исследований, согласие пациентов не требуется.

Таблица 3 – Список использованных штаммов энтеровирусов вида А с датой и местом выделения

№	Номер штамма	Тип	Страна выделения	Месяц и год выделения	Диагноз
1	2	3	4	5	6
1	13384	EV-A71	Россия, Москва	Сентябрь 2000	Острый вялый паралич
2	21364	EV-A90	Россия, Москва	Декабрь 2003	Острый вялый паралич
3	21462	CV-A10	Грузия	Октябрь 2003	Энтеровирусная инфекция
4	22205	CV-A10	Таджикистан	Июнь 2004	Острый вялый паралич
5	22468	CV-A8	Армения	Август 2004	Серозный менингит
6	22809	CV-A8	Россия, Хабаровск	Июль 2004	Контакт по острому вялому параличу
7	22888	CV-A10	Россия, Омск	Июль 2004	Серозный менингит
8	23187	CV-A4	Азербайджан	Ноябрь 2004	Острый вялый паралич
9	24004	CV-A2	Россия, Омск	Март 2005	нет данных
10	24267	CV-A8	Россия, Дагестан	Июль 2005	Острый вялый паралич
11	24315	CV-A14	Россия, Мордовия	Июль 2005	Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит
12	26412	CV-A3	Кыргызстан	Июнь 2006	Острый вялый паралич
13	27190	CV-A10	Россия, Хабаровск	Сентябрь 2006	Энтеровирусная инфекция
14	27203	CV-A4	Россия, Санкт-Петербург	Ноябрь 2006	Контакт по острому вялому параличу

1	2	3	4	5	6
15	27578	EV-A71	Россия, Омск	Январь 2007	Контакт по острому вялому параличу
16	28297	CV-A6	Узбекистан	Май 2007	Острый вялый паралич
17	29055	CV-A5	Россия, Бурятия	Август 2007	Энтеровирусная инфекция
18	29072	CV-A16	Россия, Бурятия	Август 2007	Энтеровирусная инфекция
19	29089	CV-A8	Туркменистан	Август 2007	Острый вялый паралич
20	29256	EV-A71	Россия, Ставрополь	Сентябрь 2007	Острый вялый паралич
21	29518	CV-A4	Россия, Омск	Август 2007	Контакт
22	30009	CV-A7	Россия, Хабаровск	Сентябрь 2007	Серозный вирусный менингит
23	30204	CV-A5	Россия, Хабаровск	Октябрь 2007	Острый вялый паралич
24	30482	CV-A4	Россия, Пенза	Декабрь 2007	Контакт
25	31228	CV-A10	Россия, Москва	Май 2008	Острый вялый паралич
26	31758	CV-A16	Россия, Омск	Июль 2008	Энтеровирусная инфекция
27	31793	CV-A2	Украина	Сентябрь 2008	Острый вялый паралич
28	32007	CV-A2	Россия, Брянск	Октябрь 2008	Острый вялый паралич
29	32896	EV-A71	Россия, Санкт-Петербург	Сентябрь 2008	Острый вялый паралич
30	32898	CV-A16	Россия, Санкт-Петербург	Сентябрь 2008	Мислополирадикулоневропатия
31	32900	CV-A4	Россия, Санкт-Петербург	Сентябрь 2008	Энтеровирусная инфекция

1	2	3	4	5	6
32	34020	EV-A71	Россия, Калининград	Июль 2009	Серьезный менингит
33	34082	CV-A10	Россия, Санкт-Петербург	Сентябрь 2009	Прибывший из Таджикистана
34	34266	CV-A10	Россия, Москва	Октябрь 2009	Острый вялый паралич
35	34351	CV-A16	Россия, Ставрополь	Октябрь 2009	Энтеровирусная инфекция
36	34950	CV-A16	Россия, Мурманск	Ноябрь 2009	Подозрение на энтеровирусную инфекцию
37	34955	CV-A16	Россия, Мурманск	Декабрь 2009	энтеровирусная инфекция, экзантема
38	36053	CV-A10	Россия, Москва	Январь 2010	Острый вялый паралич
39	36191	CV-A4	Россия, Нижний Новгород	Декабрь 2006	Острый гастроэнтерит
40	36240	CV-A4	Россия, Москва	Май 2010	Прибывший из Таджикистана
41	37183	CV-A7	Туркменистан	Июнь 2010	Острый вялый паралич
42	37323	CV-A16	Украина	Июнь 2010	Острый вялый паралич
43	37699	CV-A2	Казахстан	Июнь 2010	Острый вялый паралич
44	37731	EV-A71	Украина	Июнь 2010	Острый вялый паралич
45	37966	CV-A4	Россия, Ставрополь	Август 2010	Здорова
46	38394	EV-A76	Россия, Мурманск	Июнь 2010	Энтеровирусная инфекция
47	38555	EV-A71	Кыргызстан	Июль 2010	Артрит
48	38905	CV-A10	Россия, Санкт-Петербург	Август 2009	Острая респираторная вирусная инфекция

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
49	39156	CV-A16	Россия, Санкт-Петербург	Сентябрь 2010	Энтеровирусная инфекция
50	39633	CV-A4	Россия, Москва	Октябрь 2010	Контакт
51	39797	CV-A4	Россия, Санкт-Петербург	Октябрь 2010	Энтеровирусная инфекция
52	40179	CV-A2	Россия, Амурск	Сентябрь 2010	Острая респираторная вирусная инфекция
53	40180	CV-A6	Россия, Хабаровск	Август 2010	Энтеровирусная инфекция
54	40181	CV-A10	Россия, Комсомольск	Август 2004	Энтеровирусная инфекция
55	40184	CV-A10	Россия, Амурск	Август 2010	Энтеровирусная инфекция
56	40188	CV-A16	Россия, Хабаровск	Июнь 2004	Энтеровирусная инфекция
57	40190	EV-A71	Россия, Хабаровск	Июль 2010	Энтеровирусная инфекция
58	40191	CV-A10	Россия, Сахалин	Июль 1905	Острый гастроэнтерит
59	40194	CV-A4	Россия, Хабаровск	Август 2010	Энтеровирусная инфекция
60	40238	CV-A4	Россия, Хабаровск	Апрель 2011	Острый вялый паралич
61	40428	CV-A6	Туркменистан	Май 2011	Острый вялый паралич
62	40879	CV-A2	Россия, Ставрополь	Июнь 2011	Острая респираторная вирусная инфекция
63	40961	EV-A76	Таджикистан	Июль 2011	Острый вялый паралич
64	41143	CV-A5	Россия, Ставрополь	Июль 2011	Острый гастроэнтерит
65	41149	CV-A2	Россия, Ставрополь	Август 2011	Нет данных

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
66	41156	CV-A6	Россия, Ростов	Июль 2011	Герпангина
67	41413	CV-A4	Россия, Москва	Март 2011	Здоров
68	41423	CV-A4	Россия, Санкт-Петербург	Август 2011	Острый вялый паралич
69	41464	EV-A71	Россия, Москва	Сентябрь 2011	Серозный менингит
70	41555	CV-A16	Казахстан	Июнь 2011	Острый вялый паралич
71	41631	EV-A76	Таджикистан	Сентябрь 2011	Острый вялый паралич
72	41755	EV-A76	Кыргызстан	Сентябрь 2011	Острый вялый паралич
73	41785	EV-A71	Россия, Курск	Октябрь 2011	Острый вялый паралич
74	41963	CV-A2	Россия, Москва	Август 2011	Нет данных
75	42096	CV-A2	Россия, Санкт-Петербург	Август 2011	Нет данных
76	42115	CV-A2	Россия, Ставрополь	Август 2011	Последствия энцефалита
77	42234	CV-A16	Россия, Уфа	Июль 2011	Острое респираторное заболевание
78	42266	EV-A71	Россия, Москва	Ноябрь 2011	Серозный менингит
79	42351	CV-A4	Туркменистан	Декабрь 2011	Острый вялый паралич
80	42593	CV-A6	Россия, Москва	Декабрь 2011	Нет данных



## 2.1.2. Штаммы энтеровирусов вида В

Для исследования филогенетических взаимоотношений ВВБС, прототипные штаммы О72 и Т75 были получены из коллекции патогенов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (Таблица 4).

Таблица 4 – Используемые штаммы

№	Номер штамма	Тип	Страна, место выделения	Год выделения	Диагноз
1	О72	CV-B5	Украина, Одесса	1972	Везикулярная болезнь свиней
2	Т75	CV-B4	Россия, Тамбов	1975	Везикулярная болезнь свиней

## 2.1.3. Прототипные штаммы энтеровирусов

В работе использовались последовательности прототипных штаммов энтеровирусов, взятые из базы данных GenBank (Таблица 5).

Таблица 5 – Прототипные штаммы энтеровирусов

№	Номер штамма в генбанке	Тип	Страна выделения	Год выделения
1	2	3	4	5
1	U22521	EV-A71 BrCr	Соединенные Штаты Америки	1969
2	U05876	CV-A16	Южная Африка	1951
3	AY421760	CV-A2	Соединенные Штаты Америки	1947
4	AY421762	CV-A4	Соединенные Штаты Америки	1948
5	AY421764	CV-A6	Соединенные Штаты Америки	1949
6	AY421763	CV-A5	Соединенные Штаты Америки	1950
7	AY421768	CV-A12	Соединенные Штаты Америки	1948
8	AY421766	CV-A8	Соединенные Штаты Америки	1949
9	AY421761	CV-A3	Соединенные Штаты Америки	1948
10	AY421767	CV-A10	Соединенные Штаты Америки	1950
11	AY421765	CV-A7	Соединенные Штаты Америки	1949
12	AY421769	CV-A14	Соединенные Штаты Америки	1950
13	AY697458	EV-A76	Франция	1991
14	AF159998	CV-B4	Нидерланды	1965

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5
15	AF160067	CV-B4	Нидерланды	1961
16	AF160068	CV-B4	Нидерланды	1962
17	AF160070	CV-B4	Соединенные Штаты Америки	1958
18	AF114383	CV-B5	Соединенные Штаты Америки	1952
19	Y14464	CV-B5	Италия	1966
20	AJ004615	CV-B5	Гонконг	1970

#### 2.1.4. Клеточные линии

Для размножения вирусов наиболее удобную систему представляют культуры клеток. В данной работе была использована перевиваемая культура клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Ведение культуры клеток проводили путем пересева, для этого с флакона с трехдневным монослоем удаляли среду и ополаскивали клеточный монослой раствором Версена (производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)). Затем вносили смесь 1:1 растворов Версена и раствора Трипсина (производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) и выдерживали при комнатной температуре 2-5 мин. После инкубации смесь удаляли и помещали флакон в термостат при температуре 37°C, пока все клетки не отделятся от ростовой поверхности. К клеточной суспензии добавляли необходимое количество ростовой среды Игла MEM (Minimum Essential Medium) (производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)), с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллина, стрептомицина) и 5% фетальной бычьей сыворотки (производства Gibco, Австралия). Полученную клеточную суспензию переносили в новые культуральные флаконы. Флаконы инкубировали в термостате при температуре 37°C с содержанием CO<sub>2</sub> 5%. Формирование монослоя происходило на 3-5 день инкубации.

Для заражения культуры клеток вирусом, ростовую среду во флаконах заменяли поддерживающей (с концентрацией сыворотки 2%) и вносили 500 мкл вирусной суспензии на 15 мл среды. Флакон инкубировали в термостате при температуре 37°C с содержанием CO<sub>2</sub> 5%. Зараженные клетки ежедневно микроскопировали для обнаружения признаков характерного ЦПД (цитопатическое действие). При обнаружении ЦПД в культуре клеток, флакон трижды замораживали/размораживали для разрушения клеток и освобождения вирусных частиц [205].

## 2.2. Молекулярно-биологические методы исследования

### 2.2.1. Выделение РНК

Выделение РНК из 100 мкл вирусной суспензии проводили при помощи набора реагентов «РИБО-сорб» (АмплиСенс, Россия) по протоколу к набору. Принцип выделения основывается на лизисе вирусных частиц в растворе, содержащем 6М гуанидина тиоцианата, адсорбции вирусной РНК на силикагелевом носителе, отмывки сорбента с РНК гуанидином, 80% этанолом, ацетоном и элюцией РНК водой, обработанной диэтилпиروкарбонатом [42]. Также выделение РНК из 100 мкл зараженной культуры клеток производили с помощью набора «РИБО-преп». Вирусные РНК выделяли из зараженной клеточной культуры путем лизиса гуанидин тиоцианатом, осаждением нуклеиновой кислоты и дальнейшей промывкой осадка, содержащего РНК, изопропанолом. Выделенную РНК растворяли в 50 мкл буфера, свободного от РНК-аз [42].

### 2.2.2. Обратная транскрипция *in vitro*

Для получения кДНК копии вирусной РНК использовали обратную транскриптазу SSII (Termo Fisher Scientific, США), или набор реагентов «РЕВЕРТА-L» (АмплиСенс, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили согласно предлагаемым производителем фермента протоколам с использованием рандомного гексамерного олигонуклеотида или специфического обратного праймера. В случае использования специфического праймера использовали следующий протокол:

- 1) смешивали РНК (до 1 мкг на реакцию), нуклеозидтрифосфаты (до конечной концентрации 0,25 mM) и праймер;
- 2) инкубировали смесь 5 мин при температуре 65°C;
- 3) пробы охлаждали до температуры 42°C;
- 4) добавляли коммерческий буферный раствор и обратную транскриптазу согласно указаниям производителя полимеразы и инкубировали смесь 1 час при температуре 42°C;
- 5) для остановки реакции прогревали пробы при температуре 75°C 10 мин.

При постановке обратной транскрипции с использованием набора «РЕВЕРТА-L» со случайным гексамерным праймером:

- 1) в содержимое пробирки GT-mix вносили 5 мкл содержимого пробирки GT-mix-1 и 6 мкл транскриптазы;
- 2) выделенную РНК соединяли с получившейся смесью в соотношении 1:1;
- 3) инкубировали смесь 30 минут при температуре 37°C.

Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР.

### 2.2.3. Постановка полимеразной цепной реакции

Подбор специфичных праймеров для исследуемых образцов производили при помощи программы BioEdit v7.0.5. Программы амплификации подбирались индивидуально для каждого случая. Для определения нуклеотидной последовательности области генома 3D использовали вложенный (nested) и ступенчатый (gradient) ПЦР.

#### Видоспецифическая амплификация энтеровирусов вида А

Для быстрого видового определения образцов энтеровирусов с неизвестным типом, потенциально относящихся к виду А, проводилась полимеразная цепная реакция на 3'НТО область генома с использованием праймеров, указанных в Таблице 6 [207].

Таблица 6 – Праймеры для видового определения энтеровирусов вида А

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
480	CCCACCAGIRRICTGGTCG	7352-7370
423	GCTATTCTGGTTATAACAAAУТУАС	7413-7388

Состав общей смеси ПЦР приведен ниже в Таблице 7.

Таблица 7 – Схема общей смеси ПЦР объемом на 25 мкл

Реагенты	Объем (мкл)	Фирма-производитель
10x буфер	2,5	Termo Fisher Scientific
Mg <sup>2+</sup> (25mM)	2	Termo Fisher Scientific
dNTP (10pmol each)	0,5	Termo Fisher Scientific
Полимераза Taq	0,5	Termo Fisher Scientific
Тридистиллированная вода	13,5	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
Праймеры (10μM)	По 2,5	Syntol
кДНК	1	

Амплификацию участков генома энтеровирусов производили на амплификаторе Терцик производства ДНК-Технология (Россия) и амплификаторе Arktik модель 5020 производства TermoFisher Scienific (Финляндия). Программа амплификации представлена в Таблице 8.

Таблица 8 – Программа амплификации на область генома 3'НТО энтеровирусов

Температура °С	Время	Количество циклов
95	3 мин	1 цикл
95	30 сек	35 циклов
42	30 сек	
72	30 сек	
72	5 мин	1 цикл
4	хранение	

Размер продукта данной реакции составляет 61 нуклеотид. В качестве положительного контроля был взят изолят 27578 (EV-A71). Электрофорез ПЦР-продуктов данной реакции проводили в 12% полиакриламидном геле, для лучшей визуализации короткого продукта амплификации (Рисунок 17).

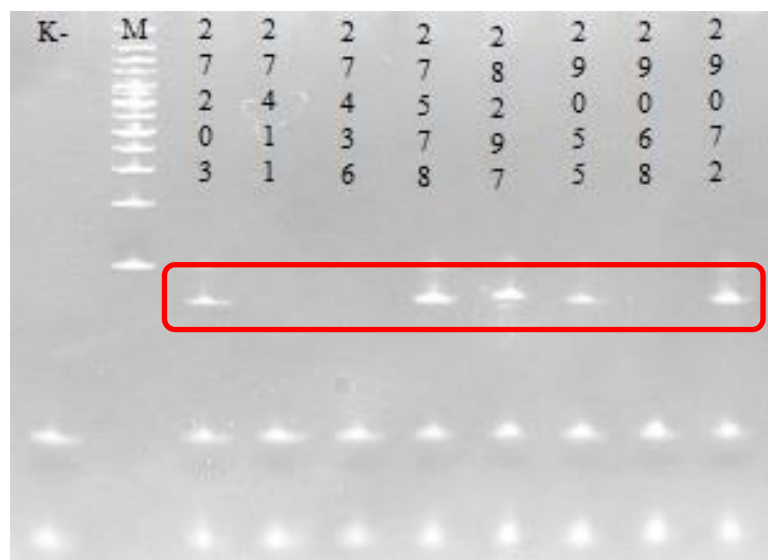


Рисунок 17 – Фотография полиакриламидного геля. Продукт реакции составляет 61 нк (выделен красным), под полосами продуктов видны полосы праймеров. К- – отрицательный контроль, М – маркер с шагом в 100 н.п., номерами указаны исследуемые образцы, 29072-положительный контроль

#### Контроль качества изолятов

Для контроля качества изолятов штаммов энтеровирусов применяли полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) к области генома 5'НТО. По результатам этой постановки можно определить наличие в образцах энтеровирусов независимо от вида. Праймеры, используемые для данной постановки, представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Последовательность праймеров для ПЦР-РВ к области генома 5'НТО энтеровирусов

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
EV-458F	GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	436-458
EV-603R	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA	603-626
EV-546Pr	/6-FAM/-CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT-/BHQ-1/	535-558

Для детекции нужного фрагмента генома энтеровирусов, проводили ПЦР-РВ: реакционная смесь приведена в Таблице 7 с добавлением зонда (EV-546Pr концентрация 3μM) в объеме 1мкл и прямого и обратного праймера (концентрация 10μM) по 1 мкл. Реакционный цикл включал 15 секунд денатурации при 95°C, 30 секунд отжига праймеров при 55°C и 30 секунд элонгации при 72°C. Анализ результатов постановки ПЦР в режиме реального времени проводили на основании наличия (или отсутствия) кривой накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM (Carboxyfluorescein). Результат интерпретировали по значению Ct (значение порогового цикла), который соответствовал точке пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией. Пороговая линия пересекает все кривые в области начала экспоненциального роста без захвата фоновых сигналов амплификации. Значения Ct менее 35 – учитывали как положительные результаты. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения используемого прибора 7500 Real Time PCR system производства Applied Biosystem (Финляндия) для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору.

Определение полной нуклеотидной последовательности области генома VP1

(нт 2439-3329) энтеровирусов методом ПЦР

Для определения полного участка VP1 в некоторых случаях использовали протокол, опубликованный ранее, с использованием праймеров 486 и 489 (Таблица 10) [207].

Таблица 10 – Праймеры для определения полной нуклеотидной последовательности участка генома VP1 энтеровирусов вида А по Оберст-06

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
486	TGGTAICARACIAAITWYGTIGTNCC	2297-2322
489	AYIGCICCSWITGYTGNCC	3348-3329

Также для определения полной нуклеотидной последовательности области генома VP1 использовали праймеры, которые были подобраны вручную, с помощью программы BioEdit, на основе последовательностей энтеровирусов вида А разных типов, доступных в GenBank. Для подбора последовательности праймеров был выбран наиболее консервативный участок консенсусной последовательности вирусов вида А. Используемые праймеры представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Последовательности праймеров для амплификации участка генома VP1 энтеровирусов вида А

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
HEV-A 2309F	TGGTATCAGACKAATTWYGTKGT	2309-2332
HEV-A 2309F2	TGGTATCAGACKAATTWYGTKGTNCC	2309-2335
HEV-A 3010F	GTKTCKGTKCCWTTYATGTCWCC	3010-3033
HEV-A 3010F2	GTKTCKGTKCCWTTYATGTCWCCNGC	3010-3036
HEV-A 3081R	GGTAKCCGTCGTAGAACCA	3081-3100
HEV-A 3081R2	GGTAKCCGTCGTAGAACCAATG	3381-3103
HEV-A 3351R	ATGGCKCKGATTGYTG	3351-3368
HEV-A 3351R2	ATGGCKCKGATTGYTGNCC	3351-3371

Амплификацию участков генома VP1 энтеровирусов вида А проводили на амплификаторе Терцик производства ДНК-Технология (Россия) и амплификаторе Arktik модель 5020 производства ThermoFisher Scientific (Финляндия). Для увеличения специфичности реакции применяли программу амплификации с понижением температуры отжига праймеров на 1°C на каждом цикле (touchdown) [207].

При неудовлетворительном результате производили коррекцию  $T_m$  (оптимальной температуры отжига праймеров): повышение температуры приводит к повышению специфичности ПЦР, понижение - к увеличению чувствительности и повышению выхода продукта. Из-за неполного соответствия последовательности праймера и необходимой области генома изучаемых штаммов, одна и та же пара праймеров с разными штаммами имела оптимальную  $T_m$  в диапазоне от 55°C до 60°C [42]. В некоторых случаях были использованы специфические праймеры для конкретных типов как при постановке реакции ПЦР, так и для обратной транскрипции.

Определение частичной нуклеотидной последовательности области генома 3D (нт 5973-6602) энтеровирусов методом ПЦР

Для штаммов энтеровирусов вида А была определена частичная нуклеотидная последовательность участка генома 3D. Для определения частичной нуклеотидной последовательности участка генома 3D всех изолятов исследуемых энтеровирусов вида А использовали полувложенный ПЦР. Амплифицируемый фрагмент со второй пары праймеров находится внутри первого продукта ПЦР, что повышает специфичность данной реакции (Рисунок 18).

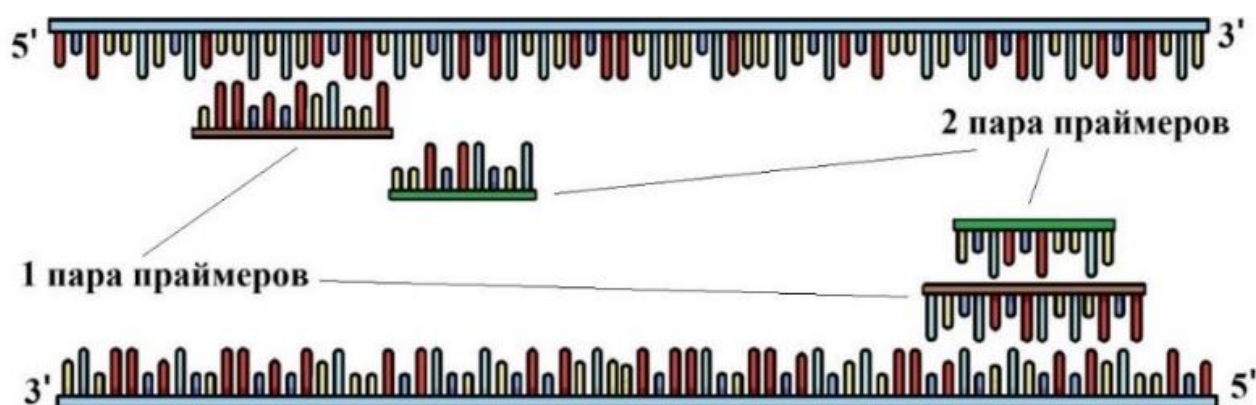


Рисунок 18 – Схема посадки праймеров для полувложенного ПЦР на кДНК для определения частичной нуклеотидной последовательности участка генома 3D энтеровирусов вида А

Праймеры для полувложенного ПЦР на участок генома 3D энтеровирусов вида А указаны в Таблице 12. Праймеры HEV-A 5900F и HEV-A 6603R использовались для первой постановки ПЦР, праймеры HEV-A 5939F и HEV-A 6605R – для второй постановки ПЦР [206].

Таблица 12 – Праймеры для определения частичной нуклеотидной последовательности участка геном 3D энтеровирусов вида А

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
HEV-A 5900F	CCAGCACTGACAGCAAARGTIATYGGSATRCAYGTTGG	5900-5938
HEV-A 5939F	AGYGARCARGGIGARATY CARTG	5939-5962
HEV-A 6603R	TACTGGACCACCTGGTCAA AIGCRAARAGIGAICCNNGG	6603-6641
HEV-A 6605R	TARTCAA AIGCRAARAGIGANCC	6606-6628

Амплификацию участков генома энтеровирусов проводили на амплификаторе Arktik модель 5020 производства TermoFisher Scientific (Финляндия). При первой постановке применяли программу с понижением температуры отжига праймеров на 1°C на каждом цикле с 62°C до 42°C.



Продукт первой реакции амплификации брали в качестве матрицы второго ПЦР. Продукт первой постановки имеет длину около 700 нуклеотидов. Во второй постановке применяли программу с понижением температуры отжига праймеров с 62°C до 47°C. Продукт второй постановки имеет длину около 660 нуклеотидов. Состав смеси для ПЦР1 и ПЦР 2 представлен в Таблице 13.

Таблица 13 – Смесь ПЦР 1 (объем 25 мкл); Смесь для ПЦР 2 (объем 50 мкл)

Реагент (концентрация)	Количество (мкл)	Реагент (концентрация)	Количество (мкл)
10x буфер	2,5	10x буфер	5
Mg <sup>2+</sup> (25mM)	2,5	Mg <sup>2+</sup> (25mM)	3
dNTP (10pmol each)	0,5	dNTP (10pmol each)	1
Полимераза Taq	1	Полимераза Taq	0,6
вода	12,5	вода	31,4
Праймеры(10μM)	2,5 каждого	Праймеры(10μM)	4 каждого
кДНК	1	ампликон 1 ПЦР	1

Определение полной нуклеотидной последовательности области генома 2С (нт 4350-4766)  
энтеровирусов вида А методом ПЦР

Для определения полной нуклеотидной последовательности участка генома 2С энтеровирусов вида А, использовали ПЦР с праймерами 4355F и 4813R по программе надзора за энтеровирусными инфекциями, одобренной ВОЗ (Таблица 14) [206,209].

Таблица 14 – Праймеры для определения полной нуклеотидной последовательности участка генома 2С энтеровирусов вида А

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
HEV-A 4355F	GCYCAУТТГТGYCGCAARTTYCA	4332-4355
HEV-A 4813R	GTSACYTCNATRTCRCARTCCAT	4813-4836

Температура отжига (T<sub>m</sub>) в данной программе была первоначально установлена 55°C, но при неудовлетворительном результате проводили изменение температуры в большую или меньшую сторону.

Определение нуклеотидной последовательности O72 и T75

Для определения полной геномной последовательности штамма T75 энтеровируса В использовали полимеразную цепную реакцию с вырожденными праймерами в области 5'-НТО, VP1 и 3D, а затем специфические праймеры для штамма T75 [98,210]. Список используемых праймеров представлен в Таблице 15.

Таблица 15 – Праймеры для определения полного генома энтеровируса вида В штамма Т75 [210]

Название	5'-3' Последовательность	Позиция в геноме
1	2	3
0000F	ТТААААСАСАГССТГТГГГТТГ	0–20
0340F	ТАСАТСАГГСАГСАТГАСАТСАССА	313–336
0420R	СТСААТАСААТСТТСРСАССАТГТС	437–413
0450F	АССССТГААТГСГГСАТААТС	456–475
0540F	АССГААССААТСАТСТТТГГГ	537–556
0640R	АТТГГССААТССААТАСАТАТГ	641–618
1100F	АСГААТГСАТСААССААССААА	1103–1125
1100F1	АТТГААТААТСААААААААААА	1073–1094
1200R	АААААТТТССАССАССАССС	1206–1187
1350F	АТТГТГТТТССААААААААААА	1332–1356
1400F1	АТТАТТТТТТТТТТТТТТТТТ	1388–1408
1700F	ААААААААААААААААААААА	1694–1719
1700R1	ААААААААААААААААААААА	1719–1697
1800R	ААААААААААААААААААААА	1792–1769
2100R	ААААААААААААААААААААА	2094–2071
2350F	ААААААААААААААААААААА	2378–2409
2450R	ААААААААААААААААААААА	2482–2458
3000F	ААААААААААААААААААААА	2957–2988
3100R	ААААААААААААААААААААА	3063–3038
3400F	ААААААААААААААААААААА	3347–3372
3600R	ААААААААААААААААААААА	3621–3587
4200R	ААААААААААААААААААААА	4160–4133
4500F	ААААААААААААААААААААА	4414–4437
4600R	ААААААААААААААААААААА	4575–4553
5150F	ААААААААААААААААААААА	5150–5174
5250R	ААААААААААААААААААААА	5244–5220
5250R1	ААААААААААААААААААААА	5263–5242
5850F	ААААААААААААААААААААА	5837–5859
5900R	ААААААААААААААААААААА	5954–5930
6400F	ААААААААААААААААААААА	6410–6432
6500R	ААААААААААААААААААААА	6531–6506

Продолжение таблицы 15

1	2	3
6800F	TTCCGGCACCSAGCATITTTAACTC	6823–6846
6900R	GCAATCACRTCRTCMCCRTA	6948–6929
6900F	GCTGAAAGTGTAYAAGGGMATTTGAYTTGG	6880–6908
7400R	ACCGAATGCGGAGAATTTACCCC	7435–7413

При постановке полимеразной цепной реакции для определения полной нуклеотидной последовательности энтеровируса вида В Т75 температура отжига праймеров варьировалась от 50°C до 65°C в зависимости от используемой пары праймеров. Условия ПЦР подбирали индивидуально для каждой пары праймеров.

В большинстве случаев, длина продукта амплификации составляла 500-800 нт. Если была необходимость амплифицировать более длинный фрагмент генома энтеровируса Т75, то время элонгации увеличивали до 1 минуты. Для амплификации полной нуклеотидной последовательности участка генома VP1 энтеровируса О72, использовали пару праймеров 2350F, 3600R, температура отжига праймеров составляла 63°C, элонгация – 90 секунд [98].

#### 2.2.4. Электрофорез ПЦР-продуктов и очистка образцов

Аналитический электрофорез проводили в 2% агарозном геле (производства helicon) на основе трис-боратного буфера с добавлением 0,001% бромистого этидия при постоянном токе 120V. Препаративный электрофорез проводили в 1% легкоплавком агарозном геле при постоянном токе 90V. Анализ размера продуктов ПЦР проводился при помощи маркера Generuler 100-bp (Thermo Fisher Scientific) (Рисунок 19). Результаты оценивались с помощью УФ трансиллюминатора INTAS (при длине волны 265 нм).

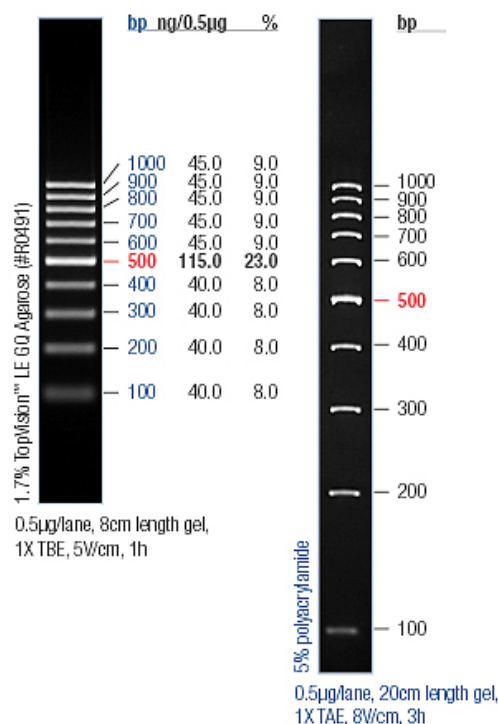


Рисунок 19 – МаркерGeneruler100-bp (<http://www.fermentas.com>)

Продукт нужной длины вырезали из агарозного геля вручную. ДНК выделяли из геля при помощи набора «QIAquick gel extraction kit» (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Очищенный ПЦР-фрагмент использовали для секвенирования. Для подготовки к секвенированию образцов делали смесь, состоящую из 40-60 нг матрицы (очищенный ПЦР-продукт), 3,2 пмоль одного из праймеров и доводили водой до конечного объема 12 мкл.

### 2.3. Определение нуклеотидной последовательности

Нуклеотидные последовательности участков генома, представленных в работе, были получены с помощью секвенирования методом Сэнгера (метод обрыва цепи), при помощи набора реагентов BigDye 3 на секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США) по стандартному протоколу. Концы генома энтеровируса вида В Т75 секвенировали методом быстрой амплификации концов Roche RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Roche Diagnostics, США) с применением технологии Step-Out RACE (Sigma-Aldrich), которая позволяет быстро амплифицировать 5'- и 3'-концевые фрагменты [211,212]. Штамм Т75 был секвенирован в Институте вирусологии, Университетского медицинского центра Бонна, Германия.

Все нуклеотидные позиции исследованных энтеровирусов вида А даны в соответствии с прототипным штаммом EV-A71 BrCr (GenBank U22521). Нуклеотидные позиции исследованных энтеровирусов вида В даны относительно генома E11 (GenBank: X80059.1) [213].

#### 2.4. Анализ нуклеотидных последовательностей

Участки генома VP1 (нт 2439-3329) энтеровирусов вида А и вида В, участки геномов 2С (нт 4350-4766) и 3D (нт 5973-6602) энтеровирусов вида А изучаемых штаммов, были выровнены по аминокислотной последовательности в соответствии с рамкой считывания. Выравнивание и обработка нуклеотидных последовательностей производились с помощью BioEdit версия 7.0.5.2 [214] и MEGA X [215].

При использовании метода молекулярных часов можно получить представление о времени жизни последнего общего предка группы вирусов. Построение филогенетических деревьев для этого производили с помощью программы Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST) версия 1.10.4 и вспомогательных приложений (Beauty v1.10.4) [216]. Байесовский алгоритм, реализованный в BEAST версии 1.10.4, использовался для датирования узлов дерева в трех областях генома [178]. При обработке данных применялась модель молекулярных часов SRD06 с логнормальным распределением скорости замен ослабленных молекулярных часов, которая была предпочтительнее предположения о строгих молекулярных часах при тестировании байесовского фактора ( $\log_{10}$  байесовский коэффициент вероятности дерева  $> 10$ ) [217]. Каждый анализ проводился с построением 10 000 000 деревьев, и отбиралось каждое 1000 дерево, в результате чего получалось 10 000 деревьев. Полученные результаты оценивали с использованием Tracer v1.5.0, чтобы обеспечить эффективный размер выборки, с значением ESS (Effective Sample Size) больше 200 для всех параметров. Консенсусное дерево, учитывающее апостериорное распределение, создано с помощью TreeAnnotator версия v1.10.4 с использованием выжигания (burn-in) 2000 деревьев. Деревья были визуализированы с помощью FigTree версия v1.4.3. Для оценки эволюционных расстояний между последовательностями энтеровирусов вида А вычисляли долю нуклеотидных различий между каждой парой последовательностей. Матрицу молекулярно-генетических расстояний (метод Кимуры по двухпараметрической модели) получили с помощью программы MEGA X. Пару попарных расстояний между одинаковыми штаммами в двух областях генома нанесли на график.

Построение графика сходства нуклеотидных последовательностей и графика бутскан-анализа, для энтеровирусов вида В, производили с помощью программы SimPlot v 3.5.1 со скользящим окном в 500 нуклеотидов с шагом в 50 нуклеотидов [186,210].

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Получение нуклеотидных последовательностей энтеровирусов

Рекомбинационные события у энтеровирусов вида А изучены в меньшей степени, чем у других видов. Это связано с меньшим количеством выделяемых вирусов из клинического материала и из сточных вод. Скорее всего, это связано с двумя разными факторами. Во-первых, некоторые энтеровирусы в настоящее время не могут быть выделены на культуре клеток, и, во-вторых, клеточная линия RD, используемая во всем мире предпочтительно поддерживает репликацию энтеровирусов вида В даже в присутствии представителей других энтеровирусов [88].

Для изучения рекомбинационных событий у энтеровирусов вида А, было выбрано 3 участка генома: полный фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей структурную область VP1 (2439-3329 нт), часть нуклеотидной последовательности, кодирующей неструктурную область 2С (4350-4766 нт) и часть нуклеотидной последовательности, кодирующей неструктурную область 3D (5973-6602 нт). Позиции нуклеотидных последовательностей указаны по позициям прототипного штамма EV-A71 BrCr, номер доступа U22521. Данные участки находятся в разных областях генома (структурной и неструктурной) и расположены на сравнительно одинаковых расстояниях друг от друга (Рисунок 20).

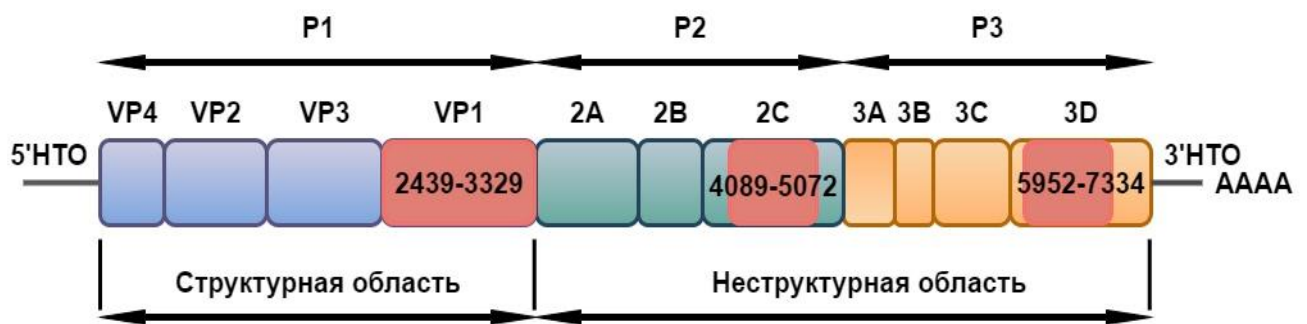


Рисунок 20 – Схема расположения исследуемых областей генома энтеровирусов вида А. Красным показаны области, взятые для исследования

Между участками генома, кодирующими капсидный белок VP1 и белок, гомологичный хеликазе 2С - 750 нуклеотидных последовательностей, а между участками генома 2С и РНК-зависимой РНК-полимеразы 3D - 870 нуклеотидных последовательностей. Во многих работах целью исследования служили участки генома, кодирующие белки VP1 и 3D, как мишени изучения рекомбинационных событий. Для более подробного анализа эволюционных событий энтеровирусов, как облака генетической информации, нами было решено включить в анализ третью область 2С, расположенную примерно посередине между данными участками и

имеющую достаточно возможностей для подбора праймеров, адаптированных для всех изучаемых типов энтеровирусов вида А.

Все отобранные изоляты вирусов, вызывали специфический ЦПД при пассировании на культуре клеток RD на 3-4 день. Для некоторых образцов был известен тип вследствие рутинного типирования в лаборатории по надзору за полиомиелитом и другими энтеровирусными инфекциями с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Образцы энтеровирусов с неизвестным типом были амплифицированы в полимеразной цепной реакции области генома 3'НТО (7352-7413) для установки их принадлежности к энтеровирусам вида А. Все положительные образцы, относящиеся к энтеровирусам вида А, были взяты для дальнейшего исследования. Схема этапов работы представлена на Рисунке 21.

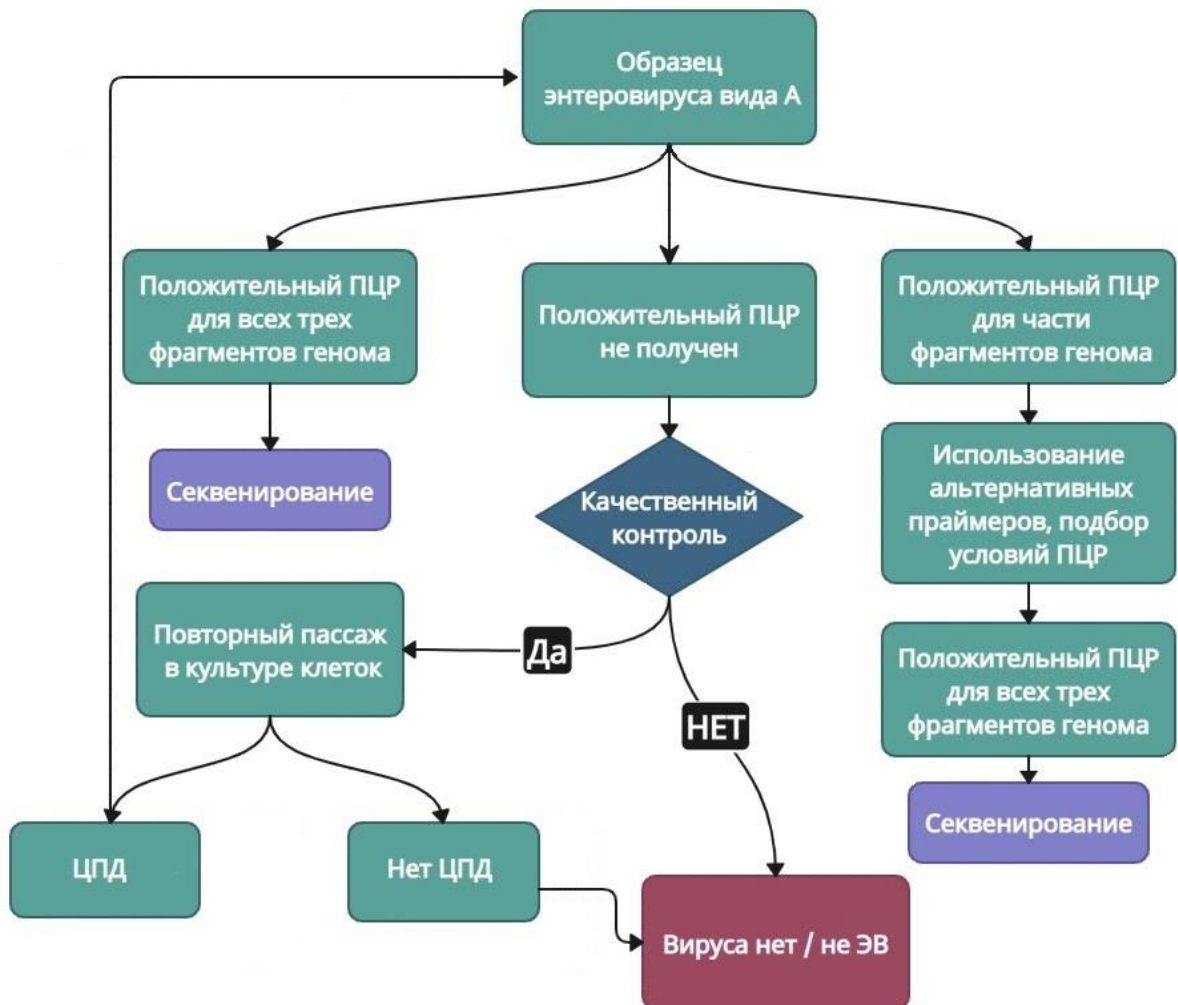


Рисунок 21 – Схема последовательности отбора образцов энтеровирусов вида А

Одной из задач работы было получение нуклеотидной последовательности трех фрагментов генома энтеровирусов вида А путем постановки полимеразной цепной реакции к трем участкам генома: VP1, 3D и 2C. Для этих участков генома была определена нуклеотидная

последовательность [206]. Для части штаммов, положительный результат был получен при использовании альтернативных праймеров и подборки дополнительных условий полимеразной цепной реакции. Подбор праймеров с широким диапазоном специфичности для энтеровирусов осложняется высокой степенью их генетической гетерогенности. В результате оптимизации условий ПЦР, разработки полу-вложенной ПЦР и тщательного подбора праймеров были амплифицированы и определены нуклеотидные последовательности всех запланированных фрагментов областей генома энтеровирусов вида А. При неудовлетворительном результате производился контроль качества образцов с использованием методик программы ВОЗ по контролю за полиомиелитом. Если вирусная кДНК обнаруживалась в образцах, то производился повторный пассаж вирусосодержащей жидкости на культуре клеток RD. При получении характерного ЦПД на культуре клеток, данный материал брался повторно в исследование. Если результат при качественном контроле или при пассаже был отрицательный, данный материал не брался в дальнейшее исследование.

В результате работы было выявлено 80 образцов неполиомиелитных энтеровирусов вида А, выделенных от больных и от контактировавших с больными людьми в различных городах России и странах СНГ в 2003-2011 годах. Все изоляты вызывали характерное ЦПД на культуре клеток RD на третий день и показали положительный результат при постановке ПЦР с видовыми праймерами на 3'НТО область. Типирование вирусов проводили по полной нуклеотидной последовательности, кодирующей капсидный белок VP1 с помощью онлайн ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Все вирусы, использованные для исследования, отличались по меньшей мере на 1% нуклеотидной последовательности в области генома VP1. Более схожие последовательности были исключены из исследования на основе предварительного анализа. Было установлено, что отобранные нами образцы относятся к 13 типам энтеровирусов вида А [206,218,219]. Всего было определено 240 нуклеотидных последовательностей трех участков генома энтеровирусов вида А. Полученные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа KC879327-KC879556 [206].

Для оценки эволюционных событий и установления времени происхождения двух штаммов-прототипов O72 и T75, данные вирусы были размножены в культуре клеток RD. ЦПД, характерное для энтеровирусов, наблюдалось через 48–72 часов. Для штамма T75 энтеровируса вида В была определена полная нуклеотидная последовательность длиной 7409 нуклеотидов, а для штамма O72 везикулярной болезни свиней определена последовательность, кодирующая структурную область генома белка VP1, путем постановки полимеразной цепной реакции с вырожденными праймерами для энтеровирусов вида В [42,98]. Условия ПЦР подбирались индивидуально для каждой пары праймеров. Номера доступа GenBank полученных последовательностей энтеровирусов вида В: KT006373 и KT006374 [98].



### **3.2. Филогенетическое взаимоотношение участка генома VP1 энтеровирусов человека вида А**

Капсидный белок энтеровирусов VP1, расположен на поверхности вириона и является наиболее иммунодоминантным из всех структурных белков [163]. Нуклеотидная последовательность участка генома VP1 характеризуется отсутствием рекомбинации и коррелирует с типом энтеровирусов, а разработанные тест-системы, основанные на частичной последовательности VP1, направлены на обнаружение и идентификацию энтеровирусов в биологическом материале [208]. Для молекулярного датирования эволюционных событий у энтеровирусов классически используется область генома VP1. Это связано с отсутствием рекомбинации внутри этой области и большим количеством доступных для сравнения геномов. Для анализа динамики рекомбинационных событий во времени у исследуемых энтеровирусов вида А был проведен филогенетический анализ при помощи Байесовского подхода. Это позволяет датировать события эволюции и установить интервал времени жизни общего предка группы (tMRCA).

По результатам филогенетического анализа методом молекулярного датирования по области генома VP1 (нт 2439-3329 в прототипном штамме EV-A71 BrCr, номер доступа U22521), все отобранные нами образцы группировались с образцами, взятыми из Genbank, в соответствии с их типами, но при этом довольно значительно отличались от своих прототипных штаммов. Все прототипные штаммы исследуемых вирусов заняли корневое положение в каждой группе, кроме штамма EV-A71 BrCr (номер в GenBank U22521), CV-A7 (номер в GenBank AY421765), а также прототипного штамма «нового» энтеровируса EV-A90 (номер в GenBank AY697460) (Рисунок 22).

Время жизни последнего общего предка групп энтеровирусов было рассчитано с помощью Beast v1.10.4 и сопутствующих программ. Полученные данные значительно различались у различных типов энтеровирусов. У вирусов группы Коксаки tMRCA типа составлял 22 года для CV-A16, 49 лет для CV-A4, 89 лет для CV-A2 и 82 года для CV-A10, но были ниже, чем tMRCA EV-A71 (103 года); следовательно, EV-A71 может и быть причиной возникновения новой неврологической инфекции, но, согласно филогенетическим данным, он не может считаться «возникающим» вирусом (Рисунок 22).

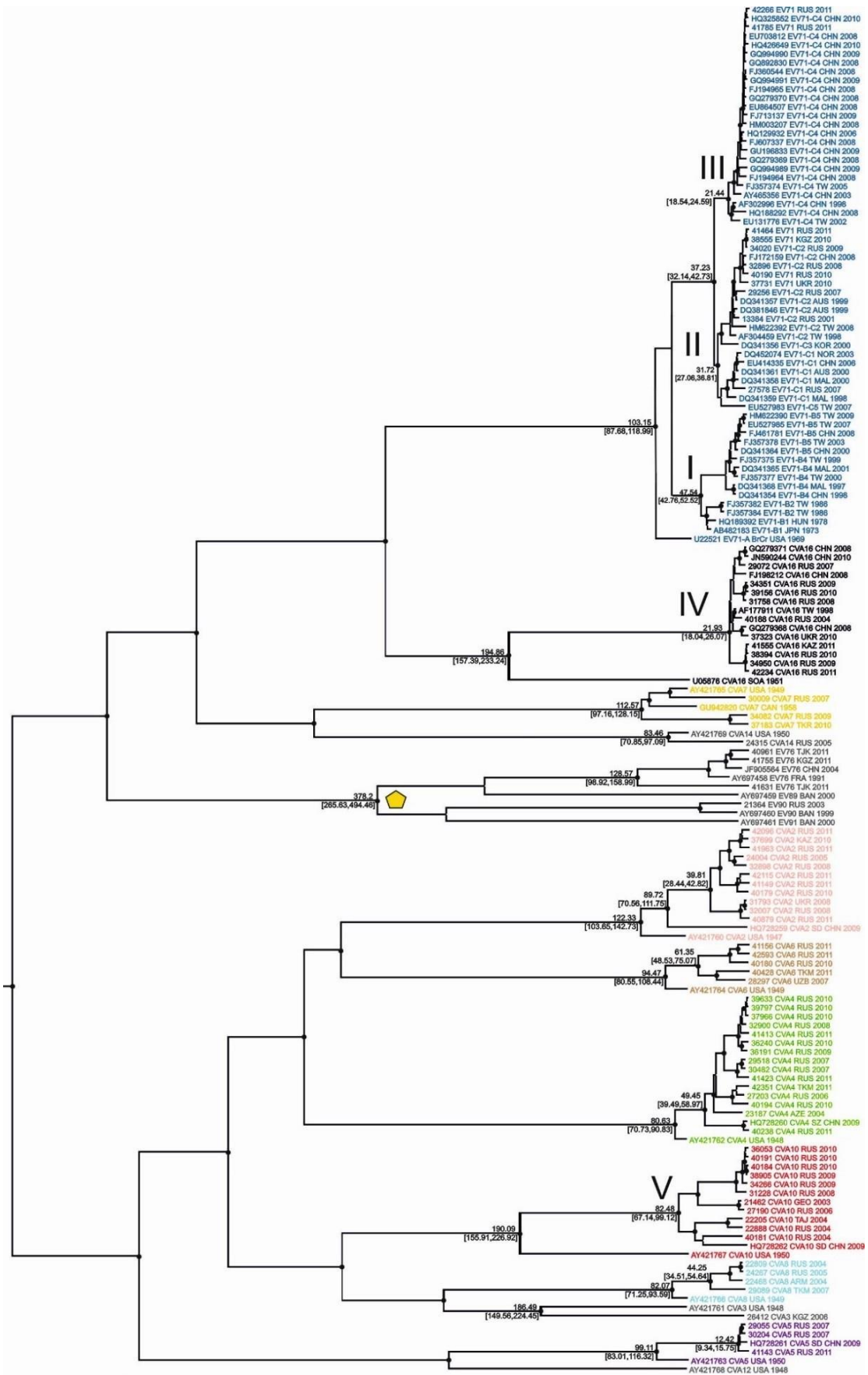


Рисунок 22 – Филогенетическое дерево участка генома VP1 (2439-3329 нт) энтеровирусов вида А, построенное в программе BEAST 1.10.4. Штаммы окрашены в соответствии с их типом. Узлы дерева с апостериорной вероятностью больше 0,75 отмечены точками. Цифрами указано время жизни общего предка с 95% доверительным интервалом. Римские цифры обозначают группы, о которых идет речь в тексте. Желтым пятиугольником отмечены «новые энтеровирусы». Шкала показывает длину ветви в годах

Общий предшественник участка генома VP1 современных штаммов (без прототипного штамма) в пределах каждого типа датируется от 12 (CV-A5) до 89 лет назад (CV-A2). Данное значение для современных и прототипных штаммов достигает до 195 лет (CV-A16). Возраст исследуемых типов вирусов с 95% доверительным интервалом (ДИ), указан в Таблице 16.

Таблица 16 – Возраст современных штаммов и возраст типов энтеровирусов вида А по участку генома VP1

№	Тип	Возраст современных штаммов	95% ДИ возраста современных штаммов	Возраст типов	95% ДИ возраста типов
1	EV-A71	37	[32,14-42,73]	103	[87,68-118,99]
2	CV-A16	22	[18,04-26,07]	195	[157,39-233,24]
3	CV-A7	-	-	112	[97,16-128,15]
4	CV-A14	-	-	83	[70,85-97,09]
5	CV-A2	89	[70,56-111,75]	122	[103,66-142,73]
6	CV-A6	61	[48,53-75,07]	94	[80,55-108,44]
7	CV-A4	49	[33,16-57,87]	80	[63,13-87,45]
8	CV-A10	82	[70,73-90,83]	190	[39,48-58,97]
9	CV-A8	44	[34,51-54,64]	82	[71,25-93,6]
10	CV-A3	-	-	186	[149,56-224,45]
11	CV-A5	12	[9,34-15,75]	99	[83,01-116,32]

Все прототипные штаммы вирусов Коксаки, выделенные около 70 лет назад, заняли базальное положение относительно современных штаммов [206]. Например, современные штаммы CV-A6, выделенные в 2007-2011 годах на территории России, Узбекистана и Туркменистана имели общего предка около 61 года назад (95% ДИ 48,5-75,1), а с прототипным штаммом CV-A6, выделенным в 1949 году в Нью-Йорке (номер в GenBank AY421764) 94 года (95% ДИ 80,6-108,4). Четыре современных штамма энтеровирусов типа CV-A8 2004-2007 годов выделения имели общего предка 44 года назад (95% ДИ 34,5-54,6), в то время как с прототипным штаммом, также выделенным в Америке в 1949 году (номер в GenBank AY421766) 82 года (95% ДИ 71,3-93,6). Прототипный штамм CV-A7 (номер в GenBank AY421765), выделенный в США в 1949 году, не принял корневое положение в группе, дата общего предка данной группы составляет 112 лет (95% ДИ 97,2-128,2). Энтеровирусы EV-A71 субгенотипов В1-В4 (группа I) имеют общего предка 47,54 года (95% ДИ 42,8-52,5), EV-A71 субгенотипов С1-С3 (группа II) - 31,72 года (95% ДИ 27,1-36,8), а EV-A71 субгенотипов С4 (группа III) - 21,44 года (95% ДИ 18,5-

24,6). Прототипный штамм EV-A71 BrCr (номер в GenBank U22521) не занимает корневое положение относительно современных изолятов, что, возможно, объясняется более поздним временем выделения -1969 год. Время жизни общего предка отобранных нами образцов EV-A71 составляет 103 года (95% ДИ 88-119). Для CV-A14 и CV-A3 выборка недостаточная, чтобы оценить примерный возраст современных штаммов, так как дата общего предка по отношению к прототипным штаммам составляет 83 года (95% ДИ 70,9-97,1) и 186 лет (95% ДИ 149,6-224,5) соответственно (Таблица 16). Новые энтеровирусы образовали отдельную группу с временем жизни общего предка около 378 лет назад (95% ДИ 265,6-494,5) и вошли в крупный кластер с EV-A71 и CV-A16. Они также группировались согласно своим типам.

Таким образом, нуклеотидные последовательности участка генома, кодирующие структурную область VP1, ожидаемо группировались в соответствии со своими прототипными штаммами. При филогенетическом анализе рекомбинационных событий среди исследуемых вирусов не выявлено. Данный фрагмент генома отличается высокой консервативностью и служит мишенью для создания тест-систем для обнаружения и идентификации энтеровирусов в клиническом материале.

### **3.3. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 2С энтеровирусов человека вида А**

Область генома, кодирующая белок 2С, является наиболее консервативной неструктурной областью, что делает ее интересной для изучения. Данная область находится на равном расстоянии от структурной области, кодирующей белок VP1, с одной стороны (750 нт) и неструктурной областью, кодирующей белок 3D, с другой (870 нт) [40]. Была определена нуклеотидная последовательность области генома 2С 80 изолятов энтеровирусов вида А, 13-ти разных типов, выделенных в различных городах России и странах СНГ в 2003-2011 годах. Все полученные нуклеотидные последовательности были выровнены по рамке считывания с теми же референсными и прототипными штаммами вирусов, взятыми для анализа рекомбинационных событий по участку генома, кодирующего капсидный белок VP1. Анализ частичной нуклеотидной последовательности области генома 2С (нт 4350–4766 по позициям в прототипном штамме EV-A71 BrCr, номер доступа U22521) исследуемых энтеровирусов вида А показал, что филогенетическое группирование значительно отличается от VP1, что указывает на множественные рекомбинационные события (Рисунок 23).

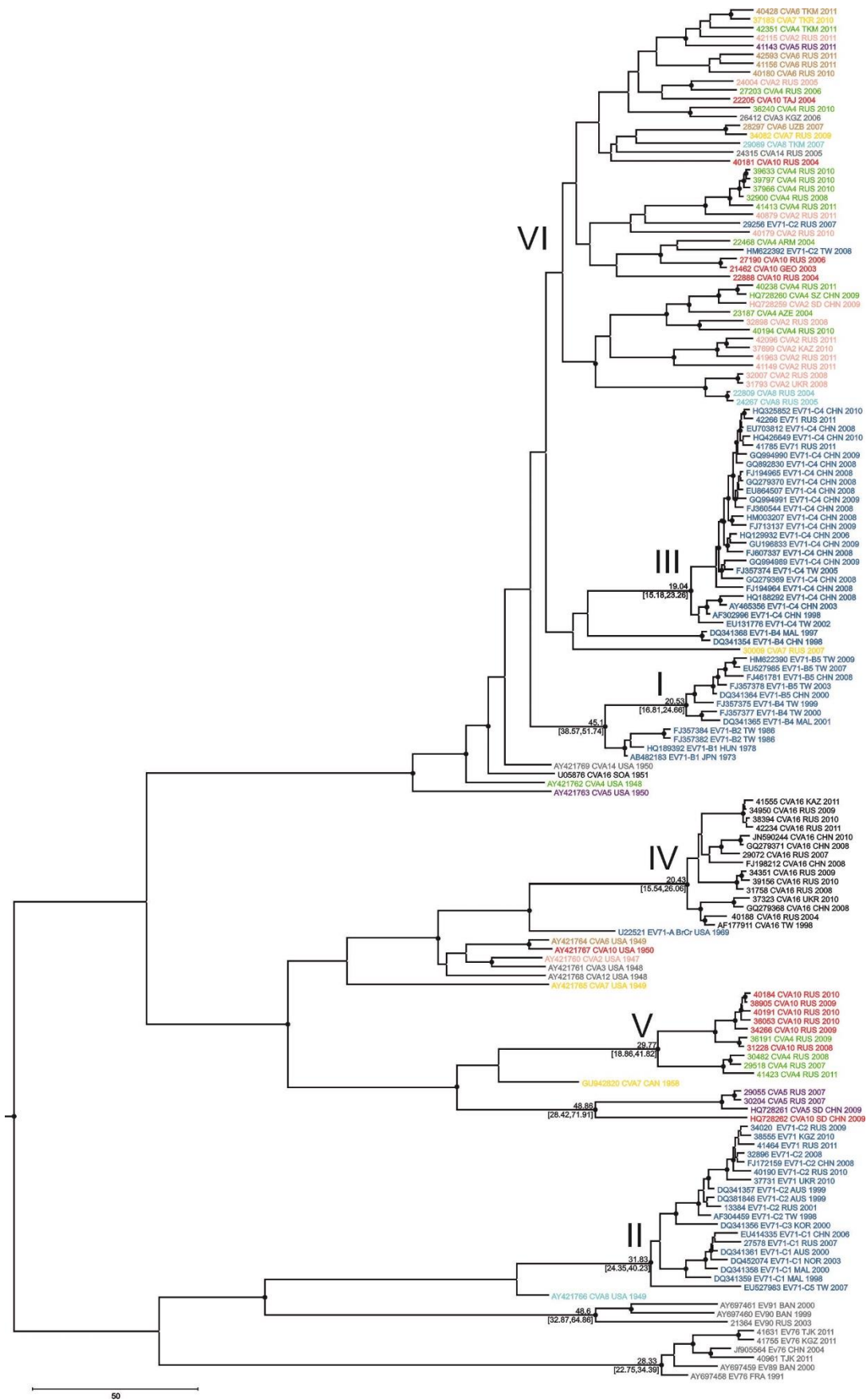


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево участка генома 2С (4350–4766 нт) энтеровирусов вида А, построенное в программе BEAST 1.10.4. Штаммы окрашены в соответствии с их типом. Узлы дерева с апостериорной вероятностью больше 0,75 отмечены точками. Цифрами указано время жизни общего предка с 95% доверительным интервалом. Римские цифры обозначают группы, о которых идет речь в тексте. Желтым пятиугольником отмечены «новые» энтеровирусы. Шкала показывает длину ветви в годах

Все вирусы Коксаки, кроме типа CV-A16, были многократно перетасованы в неструктурных областях генома. Этот вид филогенетических отношений лучше всего иллюстрируется группой VI (Рисунок 23) состоящей из 23 вирусов 11 типов, выделенных для данного исследования в России и странах СНГ в 2004-2011 годах. В эту группу также вошли штаммы из Таджикистана, Туркменистана, России, Кыргызстана, Армении, Грузии, Азербайджана, Казахстана, а также EV-A71 из Тайваня (номер в GenBank HM622392, выделенный в 2008 году), CV-A2 из Китая (номер в GenBank HQ726258 2009 года выделения). Но, к сожалению, узел этой ветви не имеет достоверного подтверждения, и делать выводы мы не можем. Вторая половина изучаемых штаммов также была распределена по филогенетическим группам, включающим другие штаммы из разных регионов. В данном случае мы наблюдаем четкую закономерность циркуляции фрагмента энтеровирусного генома. EV-A71 группировались преимущественно отдельно, разделившись на три кластера, по субгенотипам: C4 (группа III); B1-B2, B4-B5 (группа I); C1-C3 и C5 (группа II). Также образовалась отдельная филогенетическая группа, куда вошли CV-A10 и CV-A4 (группа V), выделенные только в России и имеющие общего предшественника около 30 лет назад (95% ДИ 21-41). Группу IV образовали CV-A16, куда вошли 15 штаммов из различных городов России, Казахстана, Украины, Тайвани и Китая, но не вошел прототипный штамм (номер в GenBank U05876) из Южной Африки (Камерун), выделенный в 1951 году. Новые энтеровирусы также составили две отдельные группы: первая группа EV-A90 и EV-A91 типов, включая прототипный EV-A90 (номер в GenBank AY697460) выделенный в 1999 году в Бангладеш (время жизни общего предка 49 лет назад (95% ДИ 33-65), вторая- EV-A89, EV-A76 и прототипный EV-A76 (номер в GenBank AY697461) выделенный во Франции в 1991 году (время жизни общего предка 28 лет назад (95% ДИ 22-34). Прототипные штаммы CV-A4 из Соединенных Штатов Америки (номер в GenBank AY421762 1948 года выделения), CV-A16 из Камеруна (номер в GenBank U05876 1951 года выделения) и CV-A5 из США 1960 года выделения (номер в GenBank AY421763) заняли корневое положение в верхнем крупном кластере. Также отдельно группировались прототипные штаммы CV-A6, CV-A10, CV-A16, CV-A2 и CV-A12, выделенные в Соединенных Штатах Америки в 1948-1950 гг. (номер в GenBank AY421764, AY421767, AY421760, AY421761 и AY421768 соответственно).

Таким образом, при сравнении филогенетических взаимоотношений энтеровирусов в неструктурной области генома 2С и структурной области VP1 выявлены множественные рекомбинационные события. Можно разделить типы энтеровирусов по частоте естественной рекомбинации на 3 группы. Энтеровирусы типов EV-A71 и CV-A16 почти не участвуют в рекомбинации с другими типами, но возможно рекомбинируют внутри своих групп. Другие же типы вирусов группы Коксаки вовлечены в рекомбинационные процессы в значительно большей

степени. Не сохранилось ни одной группы, соответствующей топологии филогенетического дерева по участку генома VP1. Представители «новых» энтеровирусов типов EV-A90, EV-A91, EV-A89 и EV-A76 не имели признаков недавней (менее 150 лет) рекомбинации с циркулирующими энтеровирусами «классических типов». Данное заключение следует оценивать с осторожностью, так как анализ «новых» энтеровирусов представляет затруднение из-за низкого количества выделенных вирусов и маленького количества нуклеотидных последовательностей неструктурных областей генома в GenBank.

#### **3.4. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 3D энтеровирусов человека вида А**

Неструктурная область энтеровирусного генома 3D кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая синтезирует вирусную РНК и имеет ключевое значение в репликации энтеровирусов. Данная область генома имеет высокую скорость рекомбинации. Также ранее была установлена генетическая связь между расхождением нуклеотидных последовательностей энтеровирусов в структурной области генома VP1 и вероятностью рекомбинации в неструктурной области генома 3D, что позволяет установить время полужизни рекомбинантных форм исследуемых вирусов. Была определена нуклеотидная последовательность области генома белка 3D 80 изолятов энтеровирусов вида А. Все полученные последовательности были выровнены по рамке считывания совместно с теми же референсными и прототипными вирусами, что были взяты для анализа предыдущих областей генома. Филогенетический анализ участка генома, кодирующий частичную нуклеотидную последовательность области генома 3D (нт 5973–6602 в прототипном штамме EV-A71 BrCr, номер доступа U22521) показал, что наблюдается примерно такая же картина, как и в 2С, но не столь ярко выраженная. Все анализируемые последовательности штаммов энтеровирусов вида А образовали три крупных кластера. В первый вошли 45 образцов из 79 различных типов таких как EV-A71, CV-A2, CV-A10, CV-A3, CV-A6, CV-A4, CV-A7, CV-A14, CV-A8. Второй кластер образовал 31 штамм типов EV-A71, CV-A4, CV-A10, CV-A5, CV-A16. В третий кластер вошли только новые энтеровирусы типов EV-A76 и EV-A90, вместе с прототипным штаммом EV-A76 1991 года выделения (Рисунок 24).

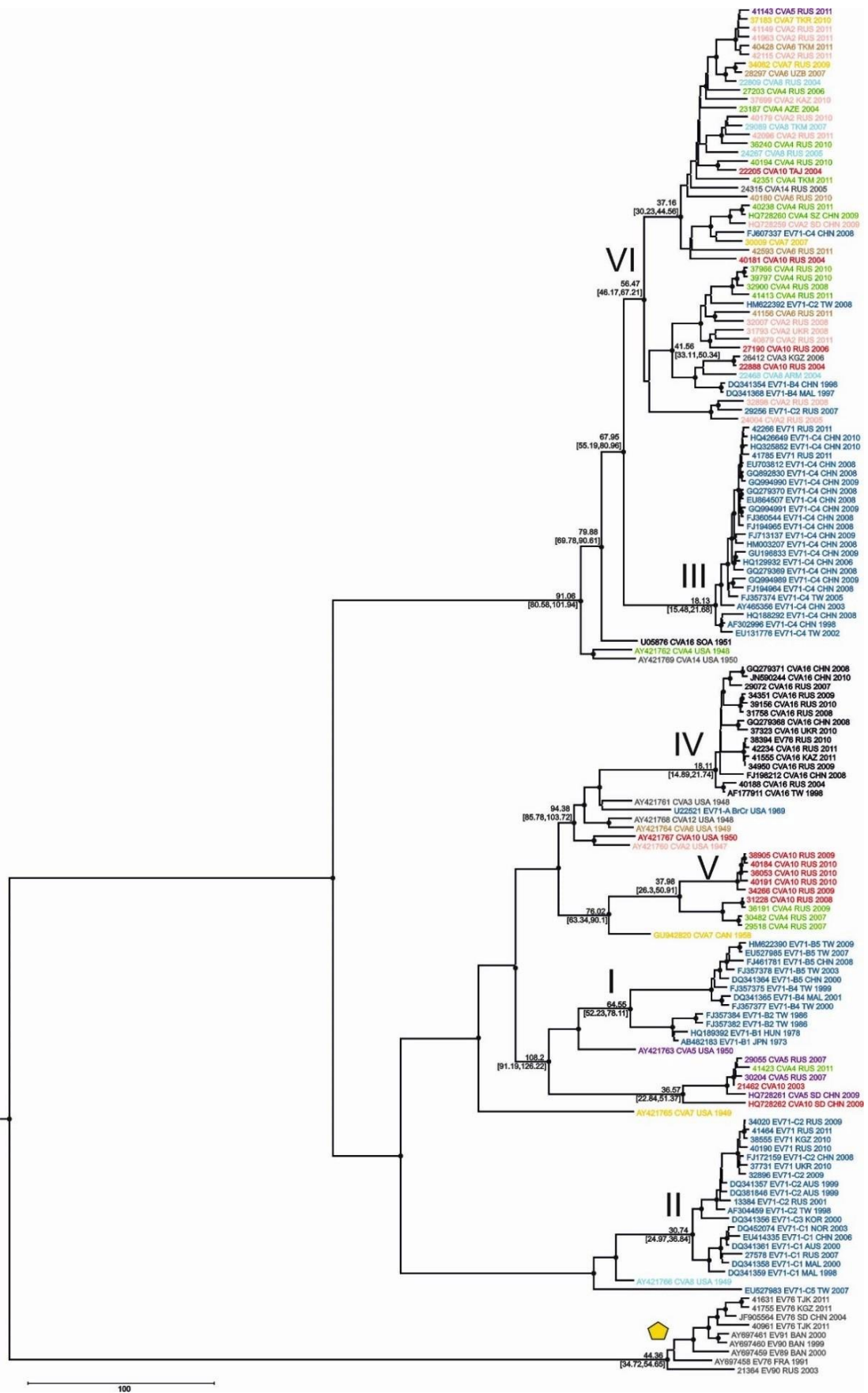


Рисунок 24 – Филогенетическое дерево участка генома 3D (5973–6602 нт) энтеровирусов вида А, построенное в программе BEAST 1.10.4. Штаммы окрашены в соответствии с их типом. Узлы дерева с апостериорной вероятностью больше 0,75 отмечены точками. Цифрами указано время жизни общего предка с 95% доверительным интервалом. Римские цифры обозначают группы, о которых идет речь в тексте. Желтым пятиугольником отмечены «новые энтеровирусы». Шкала показывает длину ветви в годах



Как и в области генома 2С, почти все штаммы типов EV71 субгенотипов В1 – В5 (группа I), EV-A71 субгенотипов С1 и С2 (группа II), EV субгенотипа С4 (группа III), CV-A16 (группа IV) образовали отдельные четыре группы и не вступают в филогенетические взаимоотношения между собой и с другими типами энтеровирусов. В первом кластере отчетливо видны две группы, куда вошли почти все типы взятых энтеровирусов (Рисунок 24 группа VI). Группу VI составляют 29 образцов 8 разных типов, таких как CV-A4, CV-A2, CV-A7, CV-A6, CV-A14, CV-A8, CV-A10, CV-A5, выделенные в 2004-2011 годах на территории России и стран СНГ, таких как Украина, Туркменистан, Таджикистан, Азербайджан, Туркменистан и три вируса EV-A71, CV-A4, CV-A2, выделенные в Китае в 2008-2009 годах. Для данной группы возраст общего предка составляет около 40 лет назад (95% ДИ 33-46). Вторую группу составляют 13 образцов 5 типов (CV-A10, CV-A3, CV-A8, CV-A2, CV-A4), выделенных в России, Кыргызстане, Армении, Украине в 2004-2011 годах и три вируса типа EV-A71: два субгенотипа В4, выделенных в Малайзии и Китае в 1997 и 1998 году соответственно, один субгенотип С2, выделенный в Тайване в 2008 году. Возраст общего предка данной группы составляет 46 лет (95% ДИ 33-54). На филогенетическом дереве участка генома 2С энтеровирусов вида А, анализировать подобную группу, куда вошли те же представители исследуемых штаммов, мы не можем, из-за низкого значения апостериорной вероятности в узле этой группы меньше 75 (Рисунок 23 группа VI).

В участке генома 3D в группе II (Рисунок 24), состоящей из энтеровирусов типа EV-A71 субгенотипа С1-С3, выделенных в России, Кыргызстане, Украине, Тайване, Австралии, Корее, Малайзии и Китае, принял корневое положение прототипный штамм CV-A8 (номер в GenBank AY421766), выделенный в Соединенных Штатах Америки в 1949 году. Данная II группа имеет общего предка с прототипным CV-A8 около 74 лет назад (95% ДИ 65-82).

Новые энтеровирусы типов EV-A76, EV-A90, вместе с прототипным штаммом EV-A76 (номер в GenBank AY697461), выделенным во Франции в 1991 году, образуют отдельную группу и не включают ни одного штамма другого типа. Эта группа имеет общего предка около 44 лет назад (95% ДИ 34-54).

Таким образом, в неструктурной области генома 3D, как и в области генома 2С, обнаружены множественные рекомбинационные события. Частота естественной рекомбинации в данной области также различается у разных типов энтеровирусов вида А. Типы вирусов группы Коксаки (кроме CV-A16) перетасованы в области генома 3D и не сохранили групп, которые мы наблюдаем при филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей структурной области генома VP1. У энтеровирусов типов EV-A71 и CV-A16, как и в области генома 2С, рекомбинационных событий представлено меньше. Данные вирусы образовали группы, соответствующие типам, за исключением единичных представителей. Все представители «новых» энтеровирусов не имели признаков рекомбинации и образовали отдельный кластер.

Вследствие вышесказанного можно сделать вывод, что все исследуемые энтеровирусы вида А по частоте рекомбинационных событий в неструктурных областях генома 2С и 3D разделяются на 3 группы: большая часть энтеровирусов участвует в рекомбинации часто, как между собой, так и с представителями других типов. EV-A71 и CV-A16 вовлечены в рекомбинацию в меньшей степени, а «новые» типы энтеровирусов не рекомбинируют с другими представителями данного вида.

### **3.5. Анализ филогенетических отношений трех областей генома энтеровирусов человека вида А**

Анализ филогенетических отношений трех областей генома: VP1 (нт 2439-3329), 2С (нт 4350-4766) и 3D (нт 5973-6602), исследуемых энтеровирусов вида А, показал многочисленные рекомбинационные события в неструктурной области генома для большинства штаммов. В структурной области генома VP1 все энтеровирусы группировались согласно своим типам. Все вирусы Коксаки, кроме типа CV-A16, были перетасованы в областях генома 2С и 3D. Этот вид филогенетических отношений лучше всего иллюстрируется группой VI в области 2С генома, состоящей из 23 вирусов 11 типов или группой VI в области 3D генома (Рисунок 23, Рисунок 24), которая включает 29 вирусов 9 типов. Вирусы, вошедшие в эту группу, составляют большую часть исследуемых типов и активно участвуют в рекомбинации. Другую частоту рекомбинации представляют EV-A71 и CV-A16. Данные типы практически во всех случаях группируются вместе в трех областях генома и реже вовлечены в рекомбинационные события. В областях генома 2С и 3D большинство штаммов EV-A71 составили три группы (группы I – III), что соответствует субгенотипам В1 – В5, С1 – С3 и С4. Было несколько последовательностей EV-A71 в неструктурной области 2С (четыре из 48 последовательностей, две генотипа В4 и две субгенотипа С2) и области 3D (пять последовательностей, четыре упомянутых выше и одна EV-A71 - субгенотипа С4), которые распределились по дереву и вошли в другие группы, что говорит о незначительной рекомбинации у отдельных представителей этого типа. Однако три группы EV-A71, присутствующие в областях генома 2С и 3D (всего 51 и 50 последовательностей соответственно), не содержали ни одной последовательности другого типа. В этих группах EV-A71 также не было значительных доказательств рекомбинации (изменения топологии дерева, поддерживаемой апостериорной вероятностью >75 %) между тремя областями генома. Точно так же все 15 изолятов CV-A16, взятых из GenBank и секвенированных в ходе данного исследования, образовали одну филогенетическую группу без признаков рекомбинации между VP1, 2С и 3D областями генома (группа IV), за исключением прототипного штамма CV-A16 (U05876 из Южной Африки (Камерун), выделенный в 1951 году). Также, в участке генома 3D, как и в участке генома 2С, образовалась смешанная группа V, куда вошли 2 типа: CV-A4 и CV-A10. В обоих

участках генома в группу входят одни и те же образцы вирусов, за исключением 41423 CV-A4, выделенного в 2011 году в Санкт-Петербурге, вошедшего в другой кластер в участке генома 3D. Возраст общего предка данной группы в участках генома 2C и 3D составляет 30 лет (95% ДИ 18-41) и 38 лет (95% ДИ 26-50) соответственно.

Таким образом, энтеровирусы вида А, представленные типами EV-A71, CV-A16, CV-A4 и CV-A10, по результатам полученных данных, характеризуются ограниченной рекомбинацией, имеют общего предка около двух десятилетий назад внутри своей группы. «Новые» энтеровирусы, представленные в нашем исследовании тремя изолятами EV-A76 и одним EV-A90, не имели признаков рекомбинации с классическими типами энтеровирусов вида А и сохранили свои группы в трех областях генома, что подтверждается ранними сообщениями о генетической идентичности этих типов [24]. Тем не менее, эти вирусы показали множество филогенетических конфликтов, включающих EV-A76, EV-A89, EV-A90 и EV-A91, подтверждая, что эти типы могут представлять собой подвид энтеровирусов вида А. Все остальные типы энтеровирусов вида А активно участвовали в рекомбинации.

Для подробного изучения рекомбинационных событий изучаемых вирусов, было проведено байесовское датирование для нерекомбинантных групп энтеровирусов разных типов. Для удобной визуализации, фрагменты филогенетических деревьев участков генома VP1, 2C и 3D с нерекомбинантными группами представлены на отдельных рисунках ниже.

Большинство EV-A71, как сказано выше, образовали три больших кластера согласно своим субгенотипам в трех областях генома и не были вовлечены в активные рекомбинационные события. Три группы EV-A71, соответствующие субгенотипам В1 – В5, С1 – С3 и С4 сохранены в трех областях генома, куда не вошла ни одна последовательность другого типа. Несколько последовательностей исследуемых штаммов распределились по дереву и вошли в другие группы в неструктурных областях 2C и 3D (Рисунок 25).

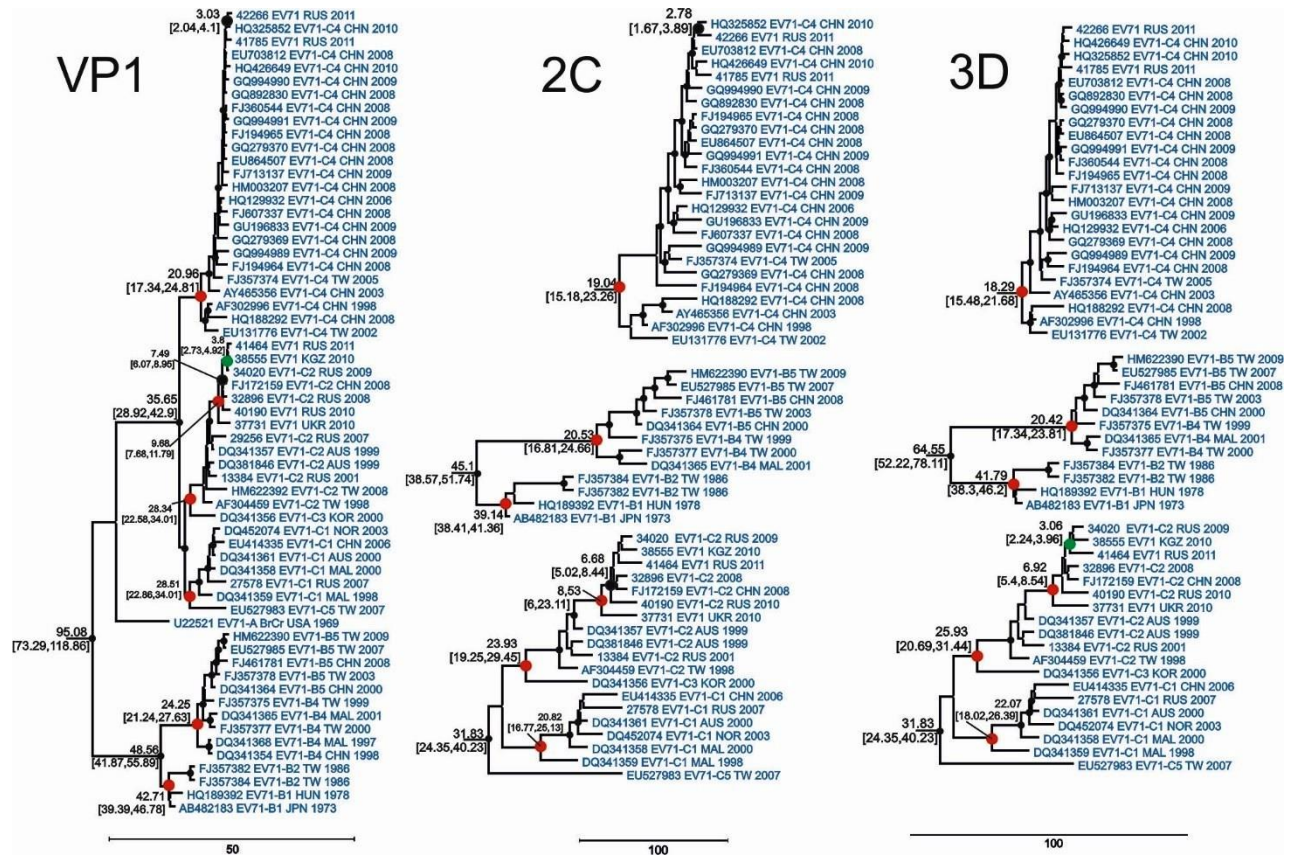


Рисунок 25 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы EV-A71. Узлы дерева с апостериорной вероятности  $>0,75$  отмечены черными точками. Красным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в трех участках генома, черным – в участках генома VP1-2C, зеленым – 2C-3D. Шкала показывает длину ветви в годах

В области генома VP1 изолятов EV-A71 образуются 9 нерекомбинированных групп, достоверно поддержанных апостериорной вероятностью выше 75 (группы с меньшей поддержкой рассматриваться и анализироваться не будут). Из них 8 групп сохранились в области генома 2C и 7 групп в области генома 3D. Участки генома 2C и 3D имеют 6 консервативных групп (Таблица 17). Возраст нерекомбинантных групп в трех областях генома (по участку генома VP1) составляет от 10 лет до 43 лет (Таблица 17 группа 4 и 9 соответственно).

Таблица 17 – Возраст групп вирусов типа EV-A71 в трех участках генома

EV-A71							
№	Номер штамма	VP1		2C		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста
1	2	3	4	5	6	7	8
1	HQ325852	3,03	[2,04-4,1]	2,78	[1,67-3,89]	нет	нет
	42266						

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8
2	34020	3,8	[2,73-4,92]	нет	нет	3,06	[2,24-3,96]
	41464						
	38555						
3	34020	7,49	[6,07-8,95]	6,68	[5,02-8,44]	нет	нет
	41464						
	38555						
	32896						
	40190						
	FJ172159						
4	34020	9,68	[7,68-11,79]	8,53	[6,23-11]	6,92	[5,4-8,54]
	41464						
	38555						
	32896						
	40190						
	FJ172159						
	37731						
5	Субгенотип С4	21,44	[18,54-24,59]	19,04	[15,18-23,26]	18,29	[15,48-21,68]
6	Субгенотип С2-С3	28,34	[22,58-34,01]	23,93	[19,25-29,45]	25,93	[20,69-31,44]
7	Субгенотип С1	22,59	[20,38-26,99]	20,82	[16,77-25,13]	22,07	[18,02-26,39]
8	Субгенотип В4, В5	24,25	[21,24-27,63]	20,53	[16,81-24,66]	20,42	[17,34-23,81]
9	Субгенотип В1, В2	42,71	[39,39-46,78]	39,14	[38,41-41,36]	41,79	[38,3-46,2]

Анализ нерекombинировавших групп энтеровирусов типа CV-A16 показал, что все изоляты оказались неактивно вовлечены в рекомбинационные события с другими типами энтеровирусов вида А, за исключением прототипного штамма U05876. Вирусы типа CV-A16 составили один кластер в трех областях генома, куда не вошел ни один представитель другого типа (Рисунок 26).

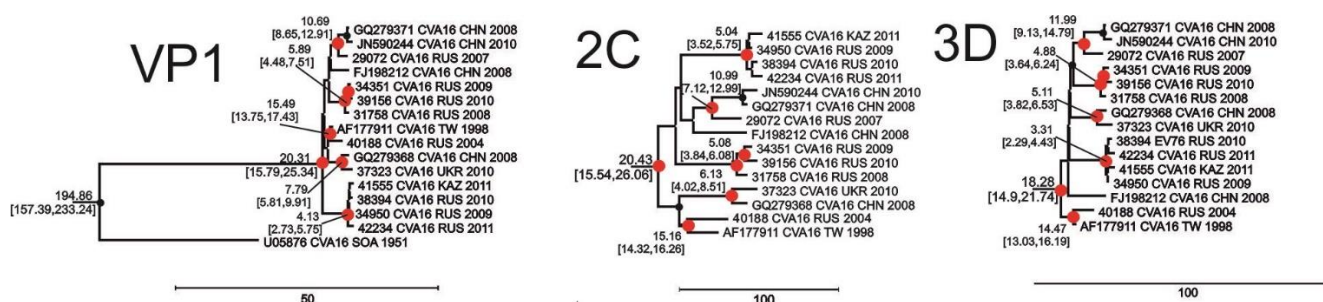


Рисунок 26 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы СAV16. Узлы дерева с апостериорной вероятности  $>0,75$  отмечены черными точками. Красным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в трех участках генома. Шкала показывает длину ветви в годах

На филогенетическом дереве изолятов CV-A16 в области генома VP1 образуются 7 нерекомбинированных групп, достоверно поддержанных апостериорной вероятностью выше 75. Все 7 нерекомбинированных групп сохранились в трех областях генома VP1, 2C и 3D. Возраст узлов дерева (по участку генома VP1), которые были сохранены в трех областях генома (достоверно подтвержденные апостериорной вероятностью выше 75), составляет от 4 лет и не превышает 20 лет (Таблица 18 группа 1 и 7 соответственно). Интересно отметить, что средний возраст нерекомбинантных групп вирусов примерно одинаковый в трех областях генома.

Таблица 18 – Возраст групп вирусов типа CV-A16 в трех участках генома

CV-A16							
№	Номер штамма	VP1		2C		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы	Возраст группы (г.)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	34351	3,69	[2,5-4,96]	3,53	[2,35-5,2]	3,86	[2,57-5,09]
	39156						
2	34351	5,89	[4,48-7,51]	5,08	[3,84-6,08]	4,88	[3,64-6,24]
	31758						
	39156						
3	40188	15,49	[13,75-17,43]	15,16	[14,3-16,26]	14,47	[13,1-16,2]
	AF177911						
4	37323	7,79	[5,81-9,91]	6,13	[4,02-8,51]	5,11	[3,82-6,53]
	GQ279368						

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7	8
5	41555	4,13	[2,73-5,75]	5,04	[3,52-5,75]	3,31	[2,3-4,43]
	38394						
	34950						
	42234						
6	JN590244	10,69	[8,65-12,91]	10,99	[7,12-12,99]	11,99	[9,12-14,79]
	GQ279371						
	29072						
7	Тип CV-A16	20,31	[15,79-25,34]	20,43	[15,54-26,06]	18,28	[14,9-21,74]

Консервативные группы, содержащие энтеровирусы типа CV-A2, были сохранены только в двух областях генома, причем в области генома 2С, только половина исследуемых изолятов вошла в один кластер, остальные были хаотично разбросаны по филогенетическому дереву (Рисунок 27).

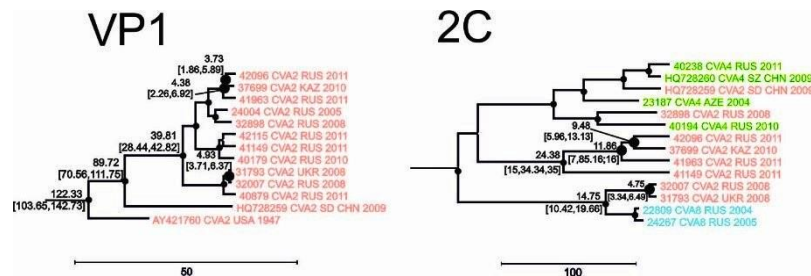


Рисунок 27 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы CV-A2. Узлы дерева с апостериорной вероятности  $>0,75$  отмечены черными точками. Черным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в участках генома VP1-2С. Шкала показывает длину ветви в годах

В области генома, кодирующей неструктурную область 3D, не сохранилось ни одной группы: все образцы вошли в один из крупных кластеров (Рисунок 24 группа VI), содержащий множество различных типов энтеровирусов вида А. Всего образовалось 3 консервативных группы. Возраст сохранившихся узлов в структурной области генома VP1 энтеровирусов типа CV-A2 от 4 до 5 лет, что в несколько раз ниже, чем в неструктурной области генома, кодирующей белок 2С (от 5 до 12 лет) (Таблица 19).

Таблица 19 – Возраст групп вирусов типа CV-A2 в трех участках генома

CV-A2							
№	Номер штамма	VP1		2C		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста
1	31793	4,93	[3,71;6,37]	4,75	[3,34;6,49]	нет	нет
	32007						
2	42096	3,73	[1,86;5,89]	9,48	[5,96;13,13]	нет	нет
	37699						
3	42096	4,38	[2,26;6,92]	11,86	[7,85;16;16]	нет	нет
	37699						
	41963						

У энтеровирусов типа CV-A4 также наблюдается высокая частота рекомбинационных событий. Одни и те же изоляты вирусов CV-A4, в неструктурных областях генома группировались в трех кластерах, но имеют только 2 общие группы без признаков рекомбинации в трех областях генома (Рисунок 28).

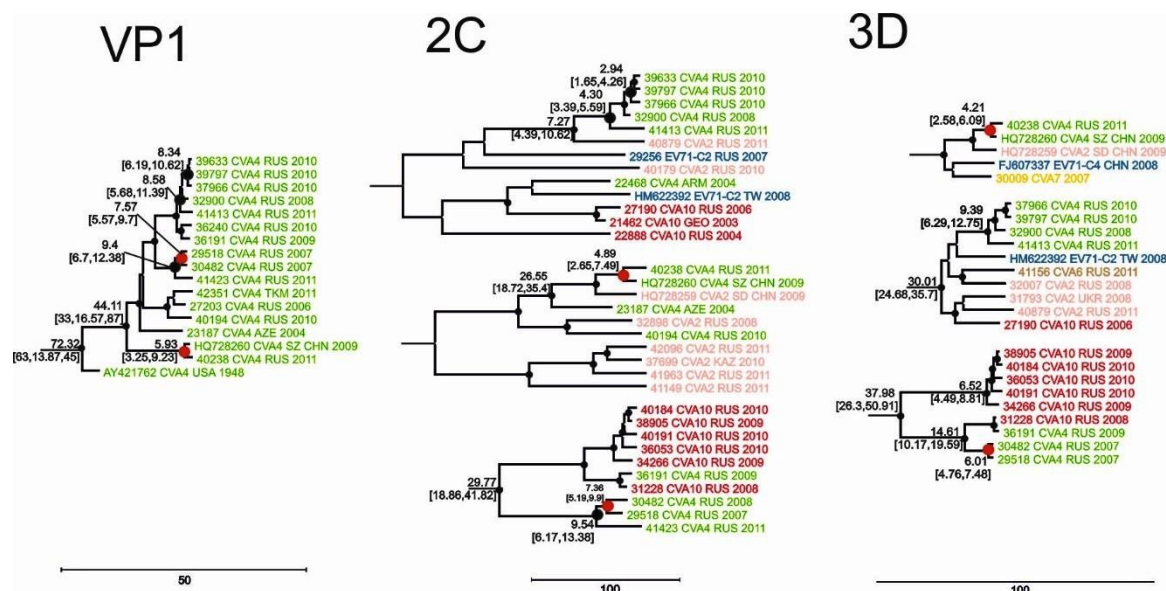


Рисунок 28 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы CV-A4. Узлы дерева с апостериорной вероятности >0,75 отмечены черными точками. Красным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в трех участках генома, черным – в участках генома VP1-2C. Шкала показывает длину ветви в годах



В области генома 3D только 2 из 5 групп вирусов не являются рекомбинантами. В области 2С сохранились 5 консервативных групп исследуемых изолятов вирусов CV-A4, что свидетельствует о том, что остальные представители этого типа активно участвуют в рекомбинации как с другими представителями энтеровирусов вида А, так и между собой. Возраст узлов, сохранившихся в области генома VP1 и 2С, почти одинаковый для всех групп и составляет от 3 до 9 лет (Таблица 20).

Таблица 20 – Возраст групп вирусов типа CV-A4 в трех участках генома

CV-A4							
№	Номер штамма	VP1		2С		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста
1	29518	7,57	[5,57-9,7]	7,36	[5,19-9,9]	6,01	[4,76;7,48]
	30482						
2	29518	9,4	[6,7-12,38]	9,54	[6,17-13,38]	нет	нет
	30482						
	41423						
3	37966	2,78	[1,75;3,9]	2,94	[1,65;4,26]	нет	нет
	39633						
	39797						
4	37966	8,58	[5,68-11,39]	4,3	[3,39-5,59]	нет	нет
	39633						
	39797						
	32900						
	41413						
5	40238	5,93	[3,25-9,23]	4,89	[2,65-7,49]	4,21	[2,58-6,09]
	HQ728260						

Анализ рекомбинационных событий энтеровирусов типа CV-A10, показал, что исследуемые вирусы имеют только одну группу без признаков рекомбинационных событий в трех областях генома, состоящую из 5 изолятов (Рисунок 29).

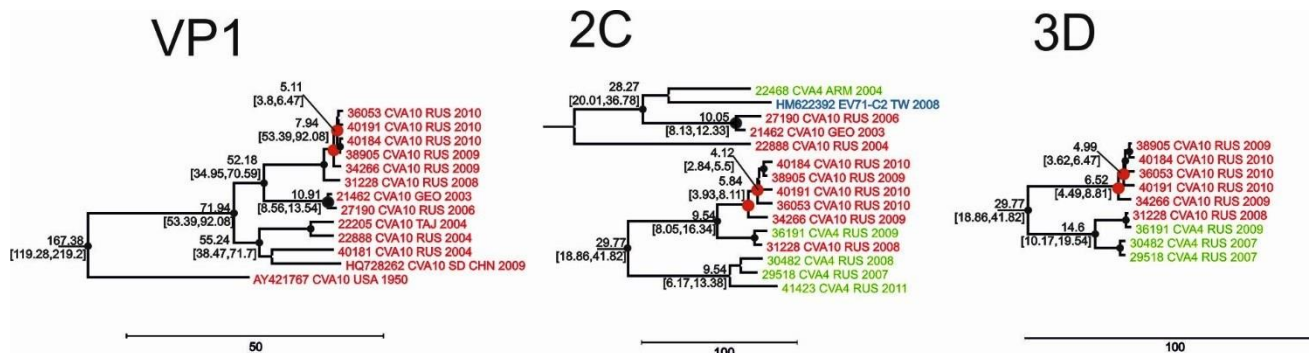


Рисунок 29 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы CV- Узлы дерева с апостериорной вероятности >0,75 отмечены черными точками. Красным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в трех участках генома, черным – в участках генома VP1-2С. Шкала показывает длину ветви в годах

На филогенетическом дереве области 2С CV-A10 сохранились 3 группы без признаков рекомбинации, а в области 3D – 2 группы. В области генома VP1 возраст нерекомбинантных групп трех областей генома составляет от 5 лет, а для участка 2С и 3D возраст этой группы примерно одинаковый (4 и 6 лет) (Таблица 21). Нерекомбинантная группа области генома VP1 и 2С имеет возраст около 10 лет в двух областях.

Таблица 21 - Возраст групп вирусов типа CV-A10 в трех участках генома

CV-A10							
№	Номер штамма	VP1		2С		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста
1	40184	5,11	[3,8-6,47]	4,12	[2,84-5,5]	4,99	[3,62-6,47]
	38905						
	40191						
	36053						
2	36053	7,94	[5,39-9,08]	5,84	[3,93-8,11]	6,52	[4,49-8,81]
	40191						
	40184						
	38905						
	34266						
3	21462	10,91	[8,56-13,54]	10,05	[8,13-12,33]	нет	нет
	27190						

При анализе нерекомбинированных групп энтеровирусов типа CV-A5 и CV-A8, установлено, что консервативные группы, были сохранены только в областях генома VP1 и 2C (Рисунок 30). В данных типах энтеровирусов сохранилось только по одной группе, куда вошли по 2 представителя из исследуемых вирусов. В области генома 3D, не сохранилось ни одной группы представленных типов энтеровирусов вида А.

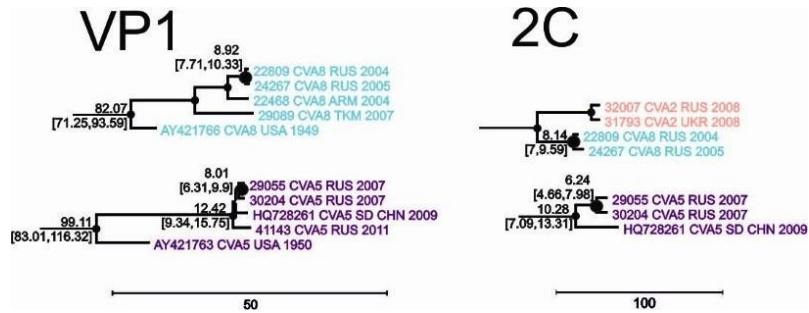


Рисунок 30 – Участки филогенетических деревьев энтеровирусов вида А, содержащие нерекомбинантные группы CV-A8 и CV-A5 Узлы дерева с апостериорной вероятности >0,75 отмечены черными точками. Черным кругом в узлах дерева отмечены общие группы в участках генома VP1-2C. Шкала показывает длину ветви в годах

Возраст жизни общего предка у нерекомбинантных групп типов CV-A5 и CV-A8 в области генома VP1 был близок: от 8 до 9 лет, а в области генома 2C составил от 6 до 8 лет соответственно (Таблица 22).

Таблица 22 – Возраст групп вирусов типа CV-A8 и CV-A5 в трех участках генома

CV-A8 и CV-A5							
№	Номер штамма	VP1		2C		3D	
		Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста	Возраст группы (г.)	95% ДИ возраста
1	22809	8,92	[7,71-10,33]	8,14	[7-9,59]	нет	нет
	24267						
2	29055	8,01	[6,31-9,9]	6,24	[4,66-7,96]	нет	нет
	30204						

Таким образом, при анализе филогенетических взаимоотношений энтеровирусов вида А по трем участкам генома, всего было выявлено 29 консервативных групп, сохранившихся между областями генома VP1 - 2C, VP1 - 3D, 2C - 3D. Количество консервативных групп было самым высоким между областями генома VP1 и 2C (28 групп) и примерно одинаковым между VP1 и 3D и областями 2C и 3D (18 и 17 групп соответственно), тогда как расстояние между этими тремя

исследуемыми областями генома примерно равны (750 нт между VP1 и 2С и 870 нт между 2С и 3D) (Таблица 23).

Таблица 23 – Количество сохранившихся узлов дерева между тремя участками генома энтеровирусов вида А

	Консервативные группы между областями генома	
	VP1	2С
2С	28 групп	-
3D	18 групп	17 групп
Всего	29 групп	

Данное наблюдение противоречит сообщениям о явной рекомбинационной горячей точке на границе структурных и неструктурных генов энтеровирусов и других пикорнавирусов [54,149,184,220]. Вполне вероятно, что видимая горячая точка рекомбинации, о которой сообщалось ранее, на стыке VP1-2А, может соответствовать только артефакту из-за более сильного филогенетического сигнала в области генома VP1. Этот сильный сигнал может быть обусловлен отсутствием рекомбинации между генами капсидов различных типов, более высокой вариабельностью области структурного генома и, следовательно, лучшей разрешающей способностью филогении. В результате, легче обнаружить горячую точку рекомбинации на границе этого региона. Неструктурные гены произвольно перетасовываются между типами каждые несколько лет, поэтому филогенетический сигнал быстро ухудшается, и при недостаточной статистической поддержке можно обнаружить меньше событий рекомбинации.

Количество представителей исследуемых вирусов разных типов, вошедших в одну группу в трех областях генома, сильно варьировалось. Группы, соответствующие генотипам EV-A71 и типу CV-A16 практически полностью сохранены в трех областях генома, средний возраст жизни общего предка по участку генома VP1 у данных представителей составляет от 20 лет (CV-A16 и EV-A71) до 48 лет (EV-A71), тогда как у других типов группы Коксаки, наименьшее количество сохранившихся представителей группы наблюдается в участке генома 3D, и средний возраст нерекombинировавших групп был от 6 (CV-A4) до 8 лет (CV-A10). С помощью Байесовского подхода в филогении можно определить скорость накопления мутаций в геноме энтеровирусов, измеряемую количеством замен на позиции в год. Замены в 1 и 2 позициях в кодонах, как правило, несинонимичные и могут менять свойства вируса. Замены в 3-й позиции кодона в большинстве случаев синонимичные и не влияют на изменение аминокислотного состава, но играют важную роль в определении генетической дистанции и исследовании эволюции вирусов. Зная скорость накопления замен, можно оценить скорость эволюции и время дивергенции типов

энтеровирусов. С помощью программы Beast v1.10.4 были рассчитаны скорости накопления нуклеотидных замен по участку генома VP1 на сайт в год для каждого типа исследуемых энтеровирусов. Показатели скорости накопления замен (выраженные как  $10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год) EV-A71 и CV-A16 были близки и составляли 3,91 (95% ДИ 3,3–4,5) и 3,22 (95% ДИ 2,1–4,4) соответственно. Для CV-A2 показатели скорости накопления замен составляли 8,32 (95% ДИ 5,4–11,6), для CV-A4 - 5,53 (95% ДИ 3,6–7,6) и для CV-A10 - 14,1 (95% ДИ 4,0–24,2) (Таблица 24). Для других исследуемых типов энтеровирусов группы Коксаки выборка вирусов была небольшая, что не может дать достоверные результаты, и они не рассматривались.

Таблица 24 – Анализ сохранившихся групп энтеровирусов вида А в трех областях генома с указанием скорости накопления замен

Тип	Кол-во членов в группах VP1/2С/3D	Филогенетические конфликты внутри группы	tMRCA в VP1, годы	Скорость накопления замен ( $*10^{-3}$ )	95% ДИ скорости накопления замен ( $*10^{-3}$ )
EV-A71 генотип В	14/12/12	Отсутствуют	48,5	3,91	[3,26–4,5]
EV-A71 субтип С1-С3	14/12/12	Отсутствуют	28,3	3,91	[3,26–4,5]
EV-A71 субтип С4	25/25/24	Отсутствуют	21	3,91	[3,26–4,5]
CV-A16	15/15/15	Отсутствуют	20	3,22	[2,12-4,39]
CV-A2	12/5/0	Присутствуют	-	8,32	[5,35–11,6]
CV-A10	12/7/5	Присутствуют	7,9	14,1	[4,01–24,2]
CV-A4	16/10/4	Присутствуют	5,9, 7,6	5,53	[3,57–7,57]

Показатель скорости накопления замен для EV-A71 составил 3,9 и был похож на ранее опубликованные данные: 4,2–4,6 и 3,7, но отличается от показателя 7,2, описанного в другой работе [215]. Важно отметить, что в последней работе более низкие показатели скорости накопления замен наблюдались в отдельных генотипах EV-A71 [3,2–7,3], что означает, что общий показатель 7,2 может быть неточным.

Ранее была установлена устойчивая взаимосвязь между дивергенцией последовательностей в области генома VP1, измеренной по парным расстояниям методом MCL (maximum composite likelihood), и вероятностью рекомбинации в области генома 3D [1,99,187]. Кластеризация в структурной области VP1 с одной и той же группой 3D демонстрирует генетическую связь между этими областями генома. В других работах такая устойчивая группа называется «рекомбинантной формой». Частоту рекомбинации можно выразить как промежуток

времени (или время полужизни), через который тот или иной вирус попадет в другую филогенетическую группу по участку генома 3D.

Для исследуемых энтеровирусов были рассчитаны средние расхождения последовательностей в капсидной области VP1 при 50% пороге рекомбинации по анализу филогенетических групп в области генома 3D, что показано на графиках (Рисунок 31, Рисунок 32). Пороговое расстояние, при котором 50% сверяемых последовательностей были рекомбинантными, составило 0,14 у EV-A71 субгенотипов С4; 0,18 для субгенотипов С1-3; 0,22 для EV-A71 субгенотипов В1, В4-5 (Рисунок 31).

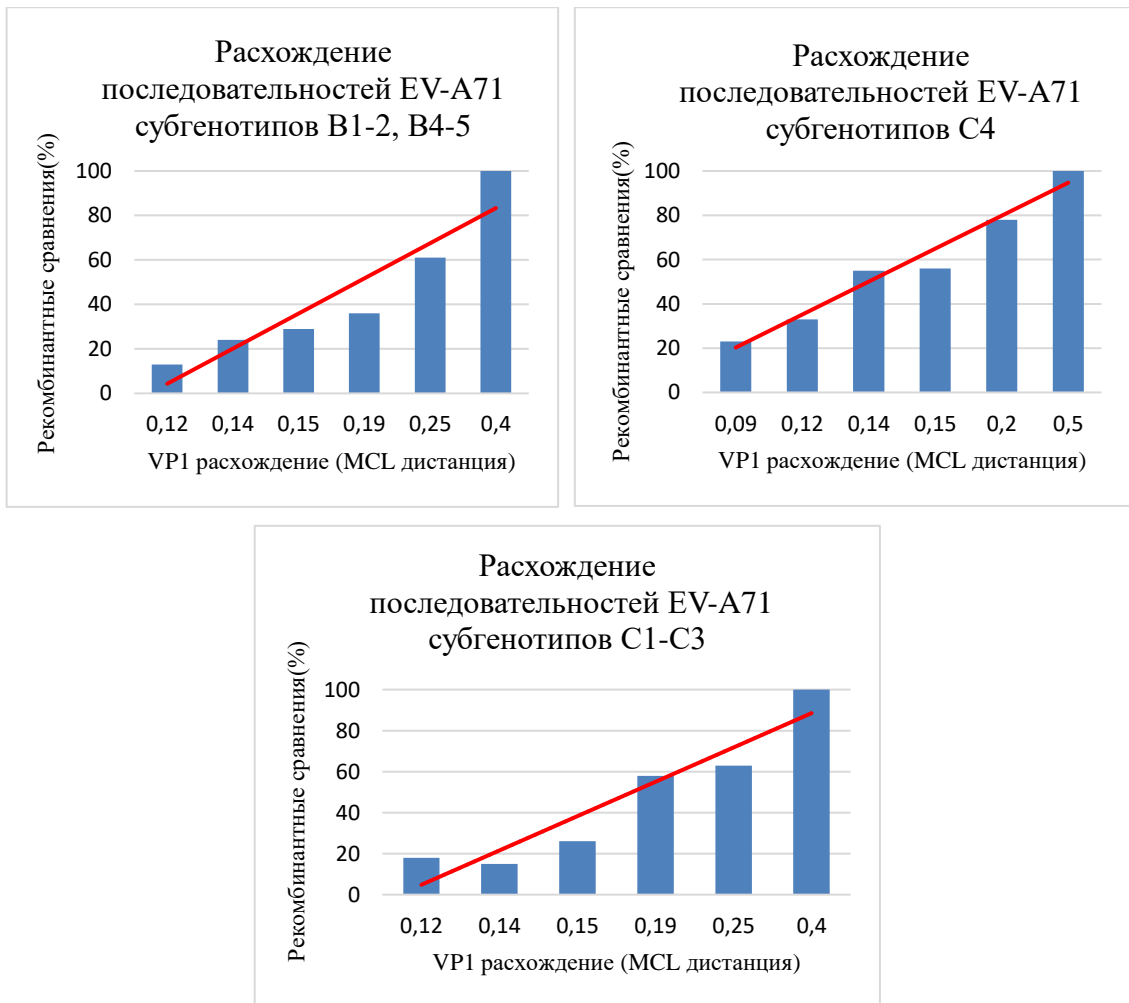


Рисунок 31 – Связь между расхождением последовательностей VP1 (рассчитанное как MCL дистанция) и долей рекомбинантных сравнений (т.е. пар вирусов, принадлежащих к разным группам в области 3D) энтеровирусов типов EV-A71 субгенотипов С1-3, С4, В1-2 и В4-5

Пороговое расстояние, при 50% частоте рекомбинации в области генома 3D, для CV-A16 составило 0,07, для CV-A10 – 0,15, а для CV-A4 и CV-A2 - 0,04 и 0,03 соответственно (Рисунок 32).

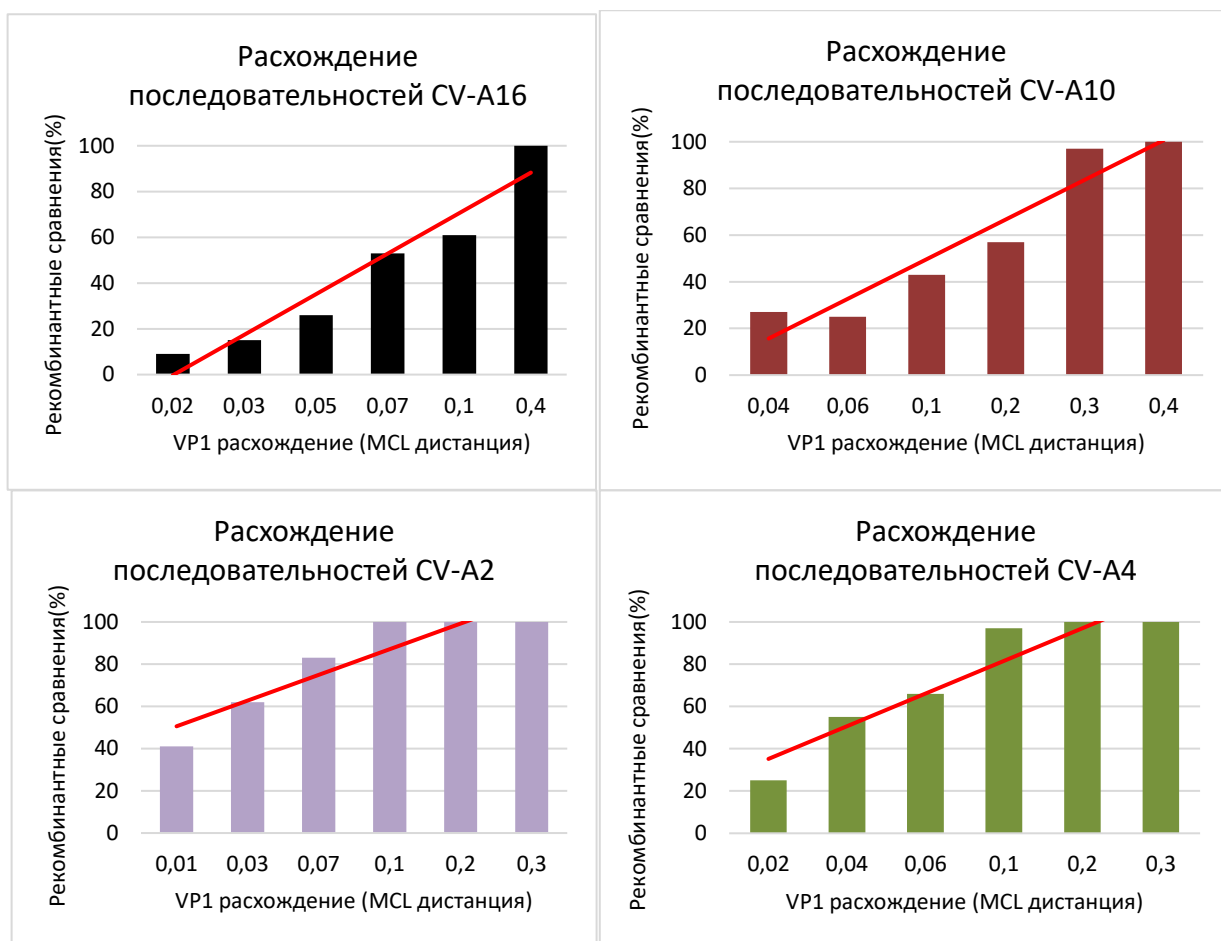


Рисунок 32 – Связь между расхождением последовательностей VP1 (рассчитанное как MCL дистанция) и долей рекомбинантных сравнений (т.е. принадлежащих к разным группам в области 3D) энтеровирусов типов CV-A16, CV-A2, CV-A10, CV-A4

Используя скорость накопления замен энтеровирусов, установленную по участку генома VP1, было рассчитано время полужизни рекомбинантных форм этих типов. Время полужизни циркулирующего EV-A71 без признаков рекомбинации составило 23 года  $((0,18/0,00391):2)$  для геногруппы C1-3, 18 лет  $((0,14/0,00391):2)$  для геногруппы C4 и 28 лет  $((0,22/0,00391):2)$  для геногруппы B1-2, B3-4. Для CV-A16 время полужизни составило 11 лет  $((0,07/0,00322):2)$ . Энтеровирусы типов CV-A4 и CV-A2 показали крайне низкое время полужизни: 3,6  $((0,04/0,00553):2)$  и 2  $((0,03/0,00832):2)$  года соответственно. Для CV-A10 время полужизни составило около 5 лет  $((0,15/0,0141):2)$  (Таблица 25).

Таблица 25 – Скорость накопления замен и определение времени полужизни рекомбинантных форм энтеровирусов вида А

№	Тип	Скорость накопления замен (*10 <sup>-3</sup> )	95% ДИ скорости накопления замен (*10 <sup>-3</sup> )	Расхождение по VP1 при 50% частоте рекомбинации	Время полужизни (г.)
1	EV-A71 (C1-3)	3,91	[3,26–4,5]	0,18	23,02
2	EV-A71 (C4)			0,14	17,9
3	EV-A71 (B1-2, B4-5)			0,22	28,13
4	CV-A16	3,22	[2,12-4,39]	0,07	10,86
5	CV-A4	5,53	[3,57–7,57]	0,04	3,62
6	CV-A10	14,1	[4,01–24,2]	0,15	5,32
7	CV-A2	8,32	[5,35–11,6]	0,03	1,8

Таким образом, внутри вида энтеровирусов вида А было выявлено два различных типа профиля по частоте рекомбинации. EV-A71 и CV-A16 рекомбинируют редко и имеют время полужизни рекомбинантных форм от 11 (CV-A16) до 28 лет (EV-A71). Другие представители вирусов группы Коксаки имеют высокую частоту рекомбинации с небольшим временем полужизни рекомбинантных форм от 2 (CV-A2) до 5 лет (CV-A10).

Чтобы дополнительно проиллюстрировать два различных паттерна рекомбинации у EV-A71, CV-A16 и других вирусов Коксаки, была вычислена доля нуклеотидных различий между каждой парой последовательностей в разных областях генома и проведена оценка эволюционных событий. График парных расстояний для исследуемых вирусов был получен при нанесении значений парных расстояний между одинаковыми штаммами в двух областях генома (отмечены разными цветами на графиках) на оси x и y (Рисунок 33).



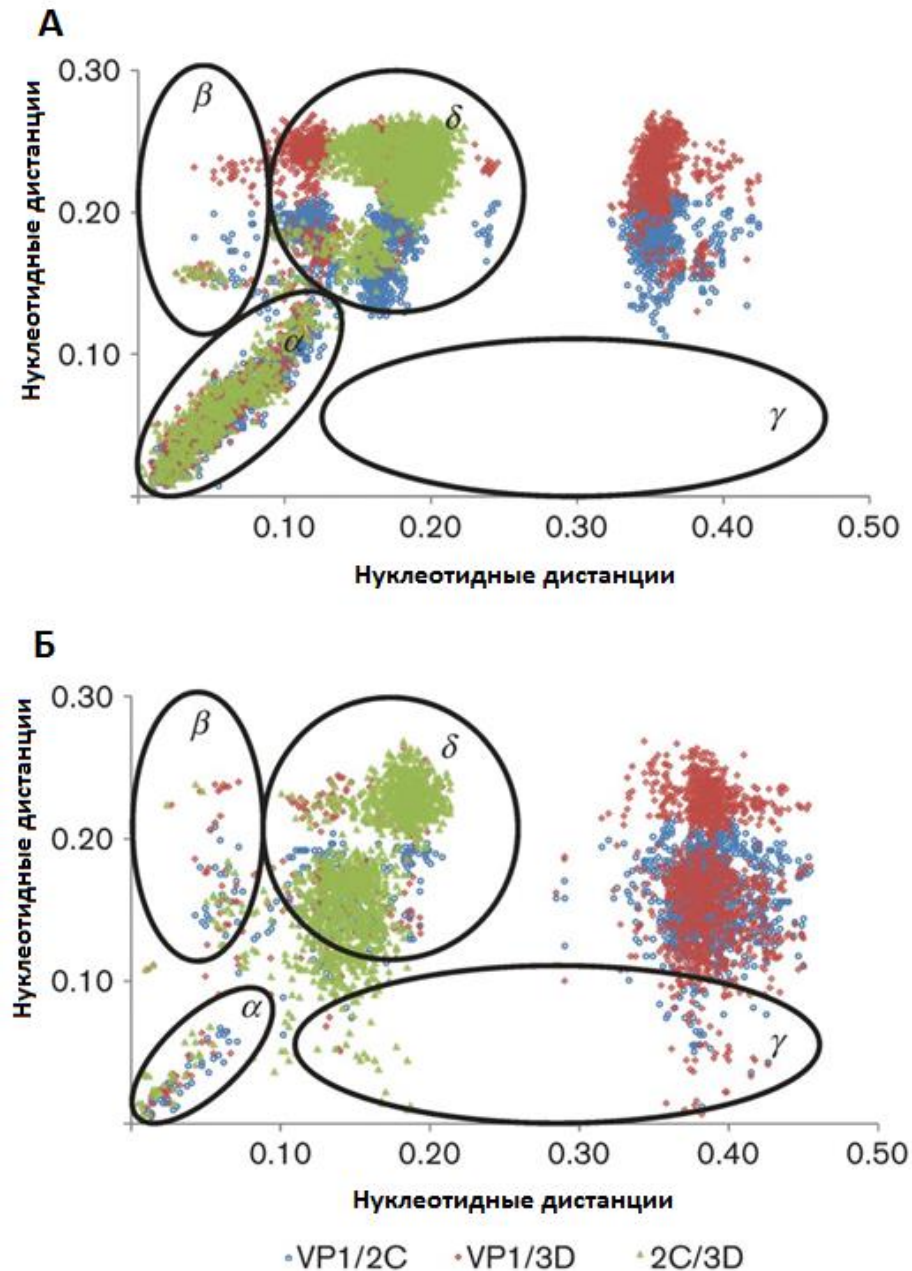


Рисунок 33 – График парных расстояний EV-A71 и CV-A16 (график А), других энтеровирусов группы Коксаки (график Б) в трех областях генома. Каждая точка представляет парные расстояния между одинаковыми штаммами в двух областях генома, рассчитанные в MEGA X. Обведенные эллипсами области описаны в тексте

При анализе графика парных расстояний EV-A71 и CV-A16 видно, что парные расстояния в трех областях генома очень хорошо коррелировали до генетического расстояния около 0,14 (Рисунок 33-А, область  $\alpha$ ), что указывает на длительную циркуляцию вирусов в отсутствие рекомбинации. Были выявлены несоответствующие парные расстояния (низкие в VP1 и высокие в 2C и 3D, Рисунок 33-А,  $\beta$ -область), соответствующие нескольким штаммам EV-A71, которые приобрели «чужеродную» область 2C и 3D генома (см. выше). В 2C / 3D и в разных областях

генома VP1 (Рисунок 33-А,  $\gamma$ -область) не было вирусов с небольшими попарными расстояниями, что согласуется с отсутствием таких вирусов на филогенетических деревьях [206].

В группу вирусов Коксаки также включены вирусы без явных признаков рекомбинации (с коррелированными попарными расстояниями), но только с генетическими расстояниями примерно до 0,07 (Рисунок 33-Б, область  $\alpha$ ). События рекомбинации, проявляющиеся как диссонирующие генетические расстояния, начиная с 0,1, охватывали все области генома (Рисунок 33-Б, области  $\beta$ ,  $\gamma$ ). У вирусов, которые отличались более чем на 0,07 своей последовательности РНК в любой области генома, расстояния попарных последовательностей были в значительной степени несоответствующими между всеми областями генома, что указывало на общую перестановку фрагментов генома путем рекомбинации (Рисунок 33-Б, область  $\delta$ ) [206].

Нужно отметить, что выборка CV-A16 была ограничена российскими штаммами, в отличие от глобально репрезентативной выборки EV-A71. Следовательно, невозможно сделать вывод, действительно ли этот тип в меньшей степени участвует в рекомбинации внутри вида энтеровирусов, тем более, что различные рекомбинантные формы CV-A16 были описаны в исследованиях ранее [100].

Таким образом, при анализе графика парных расстояний, видно, что EV-A71 и CV-A16 имеют хорошую корреляцию генетического расстояния в трех областях генома. Три участка генома вирусов группы Коксаки имеют высокие значения нуклеотидных дистанций при сравнении парных расстояний. Данное наблюдение повторно подтверждает, что эти группы вирусов вовлечены в рекомбинацию с разной частотой.

До нашего исследования 80% полных геномных последовательностей энтеровирусов вида А в GenBank приходилось на EV-A71: он был единственным типом, который вызывал повышенный интерес многих исследователей. Рекомбинация предшествовала появлению нескольких подтипов EV-A71, но паттерны рекомбинации оставались неизвестными, потому что не было доступных последовательностей современных штаммов энтеровирусов вида А для анализа [100,221]. Наше исследование показывает, что в событиях рекомбинации, приводящих к появлению подтипов EV-A71, участвуют члены глобального генофонда энтеровирусов вида А, а не только EV-A71. Это очевидно, потому что три группы энтеровирусов: I-III были равномерно распределены по филогенетическим деревьям областей генома 2С и 3D и не происходили от общего предка (Рисунок 23, Рисунок 24). Удивительно, но подтипы EV-A71 почти перестали рекомбинировать с остальной частью генофонда энтеровирусов вида А после их появления. О соответствии филогенеза EV-A71 в разных областях генома сообщалось ранее [99,100,220-222]. Наше исследование подчеркивает степень генетической сохранности типа EV-A71, который, по-видимому, рекомбинирует примерно в пять раз реже, чем другие типы, такие как CV-A2, CV-A4

и CV-A10 [206]. Кроме того, высокий период полужизни нерекомбинантных штаммов EV-A71 указывает на то, что они являются наиболее консервативными типами с точки зрения частоты рекомбинации среди энтеровирусов.

Несколько факторов могут объяснить низкую кажущуюся рекомбинацию в EV-A71. Во-первых, это может быть связано с репродуктивной изоляцией на уровне допустимых/предпочтительных типов клеток. Однако EV-A71 и некоторые другие члены энтеровирусов вида А имеют одинаковые предполагаемые клеточные рецепторы PSGL-1 и SCARB2 [223]. Кроме того, использование различных рецепторов типами энтеровирусов вида В не препятствует беспорядочной рекомбинации [5,59,134], и полиовирус свободно рекомбинирует с другими членами энтеровирусов вида С, которые не используют рецептор полиовируса [224,225]. Другим фактором, который может способствовать низкой скорости рекомбинации в EV-A71, может быть адаптация неструктурных генов к капсиду EV-A71. Такая адаптация белков 2С и VP3 была описана у энтеровирусов вида С [226]. Еще одна возможность состоит в том, что более низкая частота замещения в EV-A71 (которая может быть следствием либо частоты ошибок полимеразы, либо менее узкого места в каждом цикле инфекции) не требует такой частой рекомбинации для восстановления патогенных геномов, которые постоянно генерируются в квазидиспецифических условиях. В результате, EV-A71 может «позволить» менее частую рекомбинацию в квазивиде, что также приводит к более низкой частоте рекомбинации с вирусами Коксаки [96,206]. Наконец, длительная кажущаяся циркуляция нерекомбинантных вариантов EV-A71 может быть результатом уменьшения географического распространения и вымирания в этом типе. Было отмечено, что кажущаяся частота рекомбинации у «эндемического» E11 ниже, чем у «эпидемических» E9 и E30 [99]. EV-A71 является «эндемическим» типом, как показывает годовая схема изоляции, что хорошо соответствует низкой кажущейся частоте рекомбинации [227,96,218].

### **3.6. Филогенетическое взаимоотношение штаммов O72 и T75 энтеровирусов вида В**

Во многих работах феномен рекомбинации у энтеровирусов обсуждается в связке с их способностью становиться причиной возникающих заболеваний человека и животных. Одним из классических примеров таких новых заболеваний является ВБС, которая возникла в 1960-е гг. из человеческого вируса CV-B5. Чтобы выяснить происхождение вирусов, вызывавших ВБС в Советском Союзе, были проанализированы два штамма-прототипа O72 и T75, выделенные во время вспышек в Одесской и Тамбовской областях в 1972 и 1975 годах соответственно [98]. Была определена нуклеотидная последовательность полного генома штамма T75 и участка генома, кодирующего капсидный белок VP1, штамма O72. Энтеровирусы, принадлежащие к одному и

тому же типу, имеют более 75% идентичности нуклеотидных последовательностей в области генома VP1 [25].

Для филогенетического анализа штамма вируса везикулярной болезни свиней O72, вызвавшего эпизоотию в Одессе в 1972 году, были отобраны из Genbank последовательности CV-B5, а также последовательности ВВБС (на дереве указаны как SVDV) (Рисунок 34).

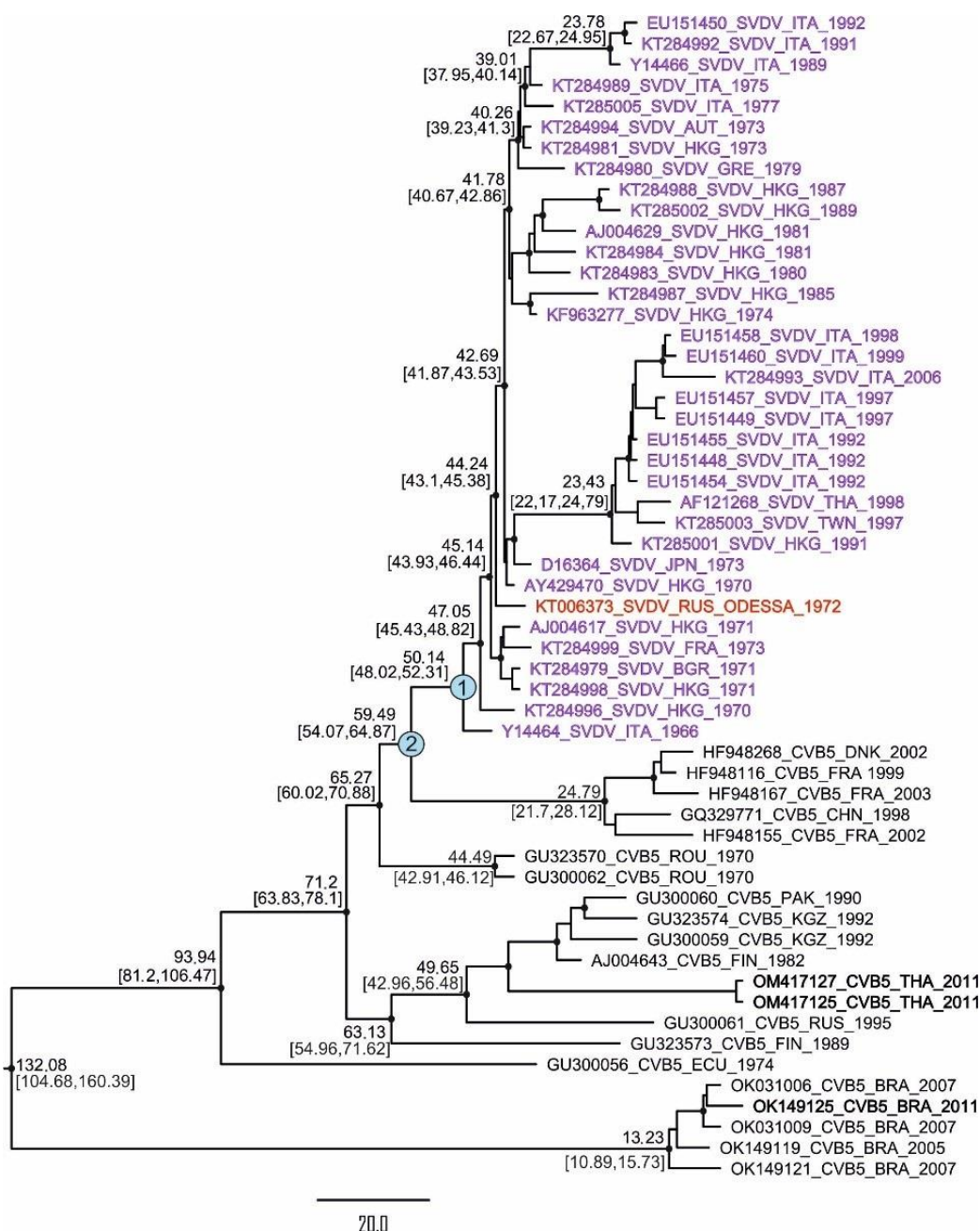


Рисунок 34 – Филогенетическое дерево по участку генома VP1 энтеровирусов CV-B5 и штамма вируса везикулярной болезни свиней O72 (отмечен красным), построенное в программе BEAST 1.10.4. Узел 1 – вирусы, выделенные от свиней с везикулярной болезнью, отмечены фиолетовым. Узел 2 - ВВБС и ближайшие к ним вирусы Коксаки В5. Узлы дерева с апостериорной вероятностью  $>0,75$  отмечены черными точками. В узлах дерева отмечен возраст кластера и 95 % ДИ этого узла. Возраст общего предка указан от даты выделения последних вирусов в этой выборке (номер в GenBank OM417125-27, выделенные в 2011 году (выделены черным)). Узлы, отмеченные цифрами, описаны в тексте. Шкала показывает длину ветви в годах

Штамм O72 был на 87,3-97,0% идентичен другим изолятам ВВБС, что подтверждает его принадлежность к этому типу [98]. Анализ проводился по полной нуклеотидной последовательности области генома, кодирующей белок VP1 (2448-3257 нт, позиции нуклеотидных последовательностей указаны по позициям штамма ВВБС, номер доступа EU151450). Советский штамм вируса ВБС, выделенный в Одессе в 1972 году, группировался со штаммами классического ВВБС (в англоязычной литературе SVDV) (Рисунок 34).

Все вошедшие в исследование ВВБС образовали один кластер. Прикорневое положение в этой группе занял прототипный штамм ВВБС, выделенный в Италии в 1966 году (номер в GenBank Y14464) (Рисунок 34, узел 1). Исследуемый вирус O72 занял корневое положение в подгруппе, куда вошло множество штаммов из Италии 1992-1999 годов выделения (номер в GenBank EU151448-64), Гонконга 1980-1981 годов выделения (номер в GenBank KT284984-83) и другие. Наиболее близкими к ВВБС вирусами, выделенными от человека, являются штаммы энтеровирусов CV-B5, выделенные во Франции в 1998-2003 годах (номер в GenBank HF948116, HF948155, HF948167), в Китае в 1998 году (номер в GenBank GQ329771), в Дании в 2002 году (номер в GenBank HF948268) (Рисунок 34, узел 2).

Филогенетический анализ методом молекулярного датирования позволяет вычислить год выделения общего предка исследуемых вирусов. Время жизни общего предка всех штаммов ВВБС составляет 50 лет, что соответствует 1961 году (95% ДИ 48-52 (1959–1963 гг.)), как и было установлено ранее (Рисунок 34, узел 1) [7]. Время последнего общего предка (tMRCA) ВВБС и наиболее филогенетически близкого CV-B5 – 59 лет, что соответствует 1952 г. (95% ДИ 54-64 года (1946–1957 гг.)) (Рисунок 34, узел 2). Штамм O72 группировался со штаммами ВВБС, выделенными в Гонконге в 1970–1971 гг. (номер в GenBank AJ0046215-17). Однако общий предок O72 и этих штаммов ВВБС датируется 3-5 годами ранее до выделения O72, и невозможно сделать вывод о том, был ли вирус завезен в Советский Союз непосредственно из Гонконга или через какое-то промежуточное место [98].

Таким образом, ВВБС, скорее всего, возник между 1946 и 1963 годами (95% ДИ последнего общего предка ВВБС (меньшее значение) и последнего общего предка ВВБС с CV-B5 (большее значение)).

По результатам анализа последовательностей областей генома VP1 данных штаммов определено, что штамм T75 на 80,0–90,4% идентичен последовательностям вируса CV-B4 доступным в GenBank, и поэтому принадлежит к типу CV-B4 [98]. Ранее считалось, что T75 является вторым типом ВВБС [195]. Филогенетический анализ с молекулярным датированием был выполнен, чтобы определить время появления классического ВВБС и штамма T75 (Рисунок 35).

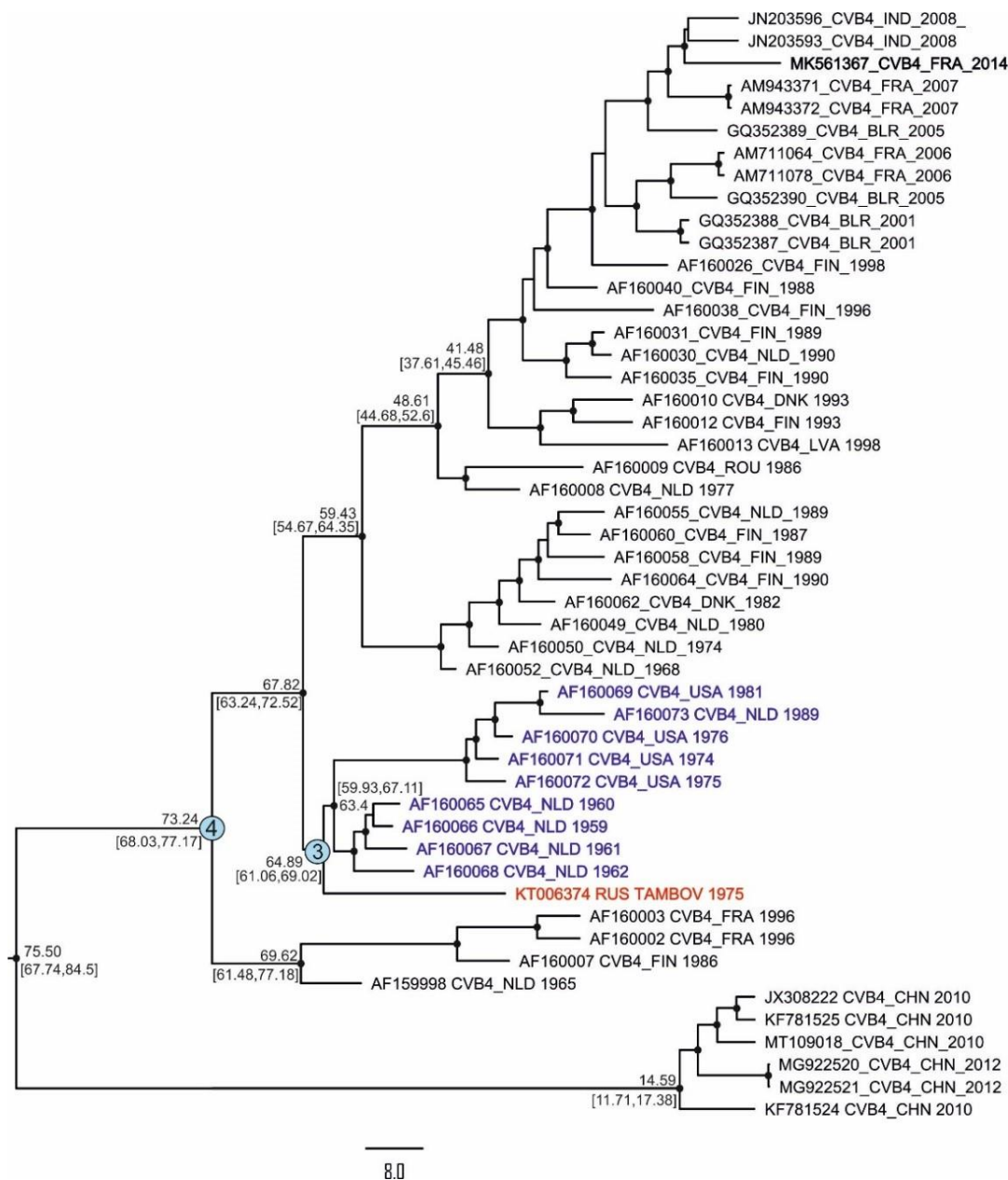


Рисунок 35 – Филогенетическое взаимоотношение по участку генома VP1 энтеровирусов CV-B4 и штамма вируса везикулярной болезни свиней T75 (отмечен красным), построенное в программе BEAST 1.10.4. Узел 3 - вирусы, вошедшие в один кластер с исследуемый штаммом (выделены фиолетовым). Узел 4 - обширная группа, описанная в тексте. Узлы дерева с апостериорной вероятностью  $>0,75$  отмечены черными точками. В узлах дерева указан возраст кластера и 95 % ДИ этого узла. Возраст общего предка в тексте указан от даты выделения последнего вируса в этой выборки (номер в GenBank MK561367, выделенный в 2014 году (выделенный черным)). Узлы, отмеченные цифрами, описаны в тексте. Шкала показывает длину ветви в годах

Советский штамм T75 группировался со штаммами энтеровирусов вида В типа CV-B4, выделенными в Нидерландах (номер в GenBank AF160065-68, AF160073), со штаммами, выделенными в Соединенных Штатах Америки (номер в GenBank AF160069-72), и занял

корневое положение в этой группе (Рисунок 35 узел 3). Ни один из вирусов этой группы не был ассоциирован с заболеваниями свиней.

Время жизни общего предка штамма Т75 и штаммов CV-B4 в области генома VP1, вошедших в один кластер, составило 65 лет назад (на момент исследования), что соответствует 1950 г., 95% ДИ этого узла составил 1945-1953 гг. (Рисунок 35 узел 3) [61-69]. Также эта группа вошла в обширный кластер с энтеровирусами CV-B4, выделенными в Европе в 1968-2014 годах (собранные группы) и штаммами из Финляндии (номер в GenBank AF160012), Дании (номер в GenBank AF160010), Латвии (номер в GenBank AF160013), Нидерландов (номер в GenBank AF160008) и Румынии (номер в GenBank AF160009). Данная группа имеет общего предка с вирусами, выделенными во Франции (номер в GenBank AF160003, AF160002), Финляндии (номер в GenBank AF160007) и Нидерландами (номер в GenBank AF159998) 73 года назад, что соответствует 1941 году (95% ДИ 68-77 (1937- 1946 гг.)) (Рисунок 35 узел 4).

Таким образом, можно утверждать, что вирус Т75 произошел от человеческого вируса CV-B4. Его время появления находится в интервале между 1945 и 1975 годами. Эта дата появления штамма Т75 соответствует предсказанному времени появления классического ВВБС, который мог возникнуть в результате крупных эпидемий вирусного менингита, зарегистрированных примерно в 1960–1961 гг. [30,98]. Кроме того, в литературе обсуждается связь происхождения классического ВВБС с использованием отходов животноводства для вскармливания свиней. Не исключено, что этот же фактор способствовал независимому происхождению штамма Т75 из CV-B4.

### **3.7. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 2С вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В**

Многими исследованиями энтеровирусов вида В доказаны множественные филогенетические конфликты в неструктурной области генома. Было высказано предположение, что возникновение вирусов, вызывающих ВБС, было связано с некими генетическими изменениями в области генома, кодирующей неструктурные белки, и такая модифицированная область генома могла передаваться между классическим ВВБС и штаммом Т75 путем рекомбинации. Кроме того, представляло интерес проверить правильность расчетов времени происхождения вирусов свиней в других областях генома.

Был проведен филогенетический анализ участка генома, кодирующего неструктурную область 2С (нт 3945-5044 по позициям в прототипном штамме ВВБС Т75, номер доступа в GenBank KT006374), с доступными полногеномными последовательностями из GenBank энтеровирусов вида В разных типов и ВВБС. Все нуклеотидные последовательности были выровнены по рамке считывания. Анализ филогенетических отношений проводили методом

молекулярного датирования. Все исследуемые энтеровирусы разделились на филогенетическом дереве на 2 крупных кластера (Рисунок 36).

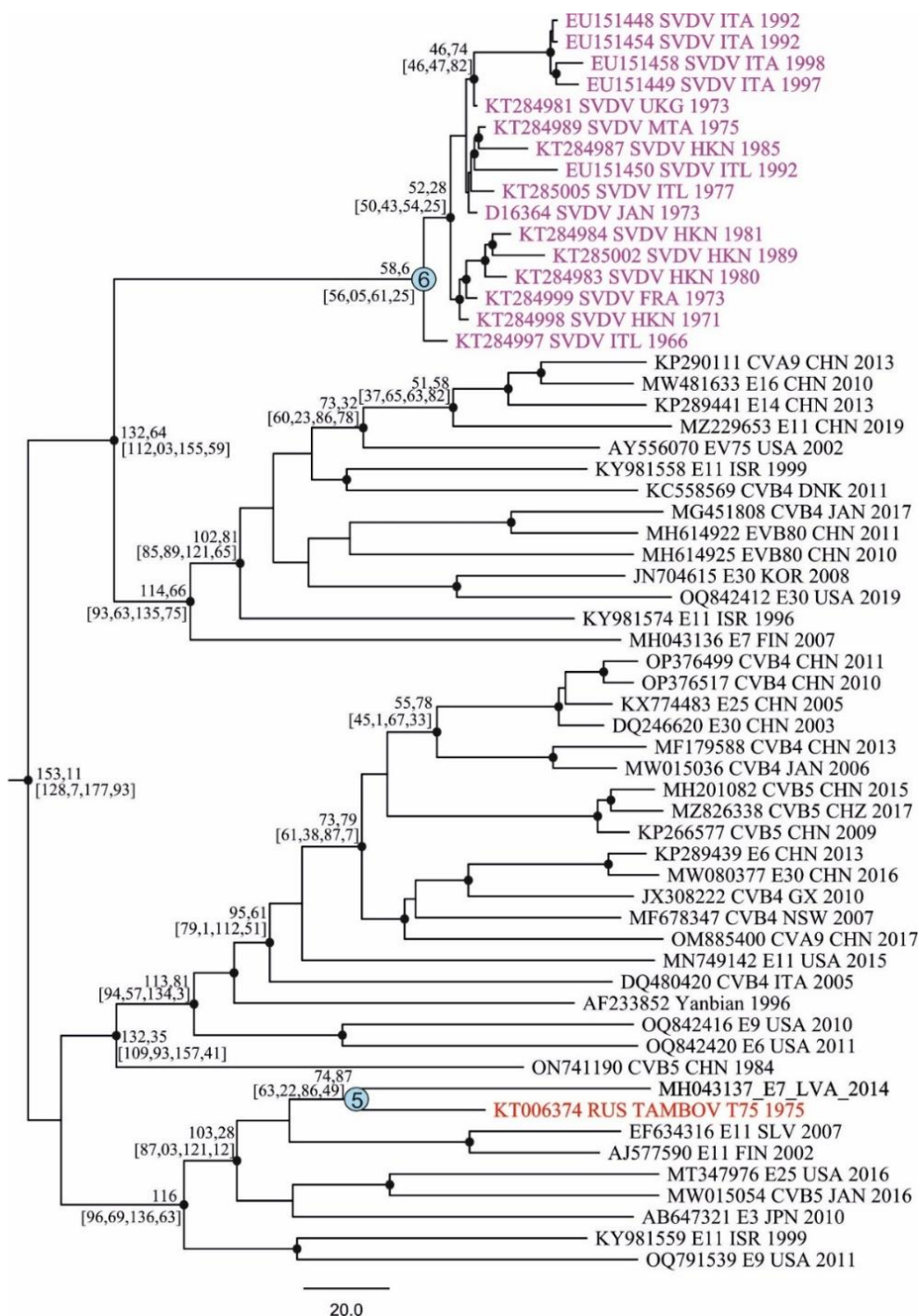


Рисунок 36 – Филогенетическое дерево по участку генома 2С энтеровирусов вида В, ВВБС (отмечены фиолетовым) и штамм Т75 (отмечен красным), построенное в программе BEAST 1.10.4. Узлы дерева с апостериорной вероятностью  $>0,75$  отмечены черными точками. В узлах дерева указан возраст кластера и 95 % доверительный интервал этого узла. Узлы, отмеченные цифрами, описаны в тексте. Шкала показывает длину ветви в годах

В области генома 2С исследуемый вирус Т75 с высокой поддержкой узла дерева группировался со штаммом Е7 (онколитический штамм RIGVIR номер GenBank MN043137)



(Рисунок 36 узел 5). Возраст общего предка этих вирусов с Т75 составил 75 лет (95% ДИ этого узла составил 63–86 лет), что соответствует 1944 году (95% ДИ 1933–1956 гг.). Энтеровирусы вида В разных типов были перемешаны между собой и образовали 3 кластера. Все ВВБС образовали отдельный кластер, куда не вошел ни один представитель других типов (Рисунок 36 узел 6). Возраст общего предка всех представленных ВВБС в области генома 2С датируется 58 годами (95% ДИ 56-61), что соответствует 1961 г. (95% ДИ 1958–1963 гг.) Интересно отметить, что такой же год появления предка представителей ВВБС получен при анализе структурной области генома VP1.

Таким образом показано, что в неструктурной области генома 2С исследуемый вирус Т75, как и в VP1, не вошел в кластер с ВВБС, но в данной области оказался наиболее близок с Е7. Предсказанное время образования ВВБС подтвердилось анализом данной области генома и указывает на 1961 год.

### **3.8. Филогенетическое взаимоотношение участка генома 3D вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В**

В неструктурной области генома 3D (нт 5895-6954 по позициям в прототипном штамме ВВБС Т75, номер доступа в GenBank KT006374), как и в области генома 2С, вирусы разделились на 2 крупных кластера. Все энтеровирусы разных типов вида В, кроме ВВБС (SVDV), перемешаны между собой в данной области генома вследствие рекомбинации (Рисунок 37).

В области генома 3D, как и в других областях генома, описанных выше, представители классического ВВБС образовали отдельный кластер, куда не вошел ни один представитель энтеровирусов вида В, выделенный от человека (Рисунок 37 узел 7). Возраст общего предка вирусов везикулярной болезни свиней составляет 61 год (95% ДИ 58-65), что соответствует 1958 году (95% ДИ 1954-1961 гг.). Исследуемый вирус Т75 группировался вместе с Е7 и Е11. Данная группа заняла корневое положение в кластере ВВБС, возраст данного узла дерева – 81 год (95% ДИ 73-90). Таким образом, Т75 отделился от представителей ВВБС в области генома 3D в 1938 г. (95% ДИ 1929-1946 гг.) (Рисунок 37 узел 8).

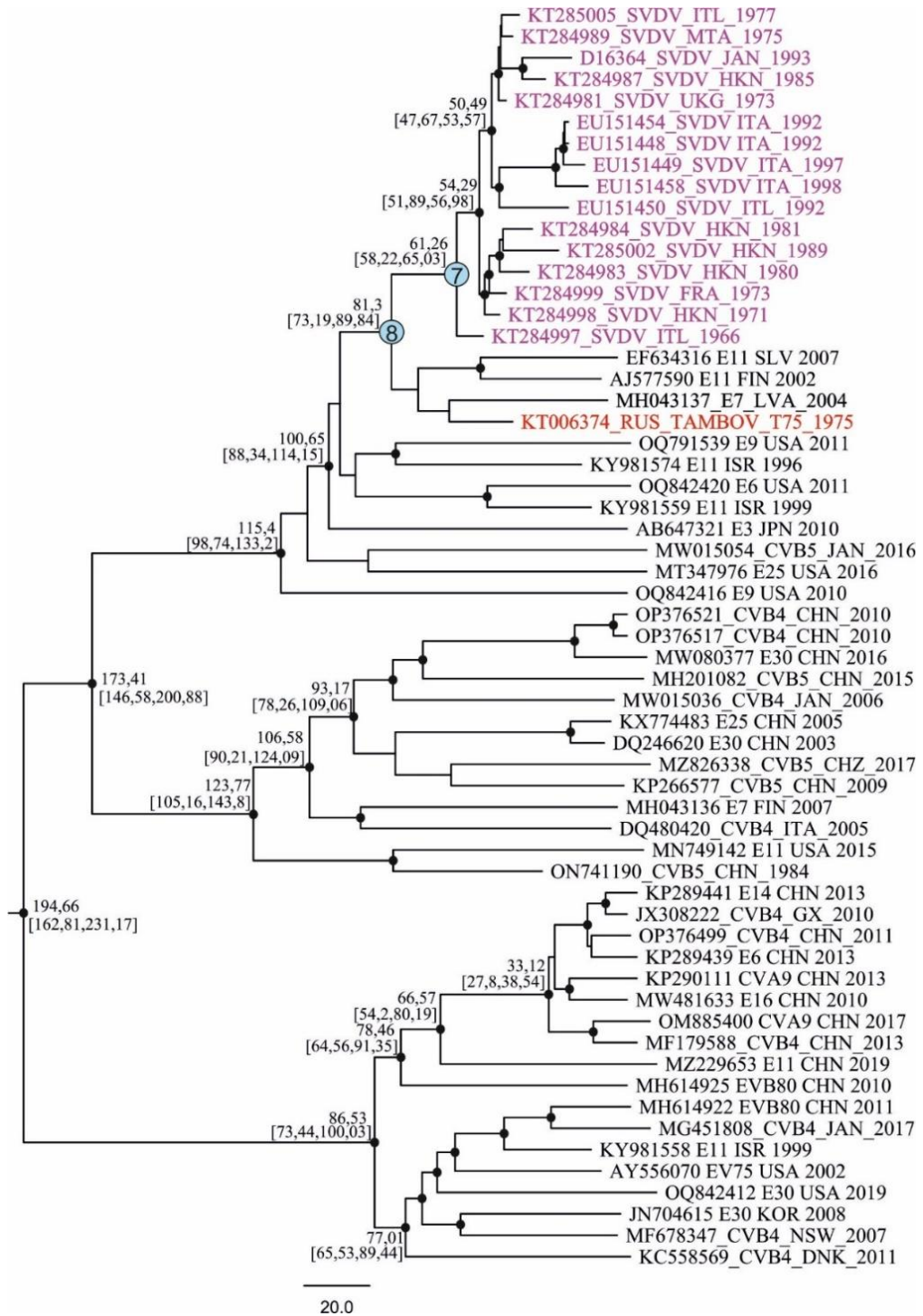


Рисунок 37 – Филогенетическое дерево по участку генома 3D ВВБС (отмечены фиолетовым) и штамма Т75 (отмечен красным), построенное в программе BEAST 1.10.4. Узлы дерева с апостериорной вероятностью  $>0,75$  отмечены черными точками. В узлах дерева указан возраст кластера и 95 % доверительный интервал этого узла. Узлы, отмеченные цифрами, описаны в тексте. Шкала показывает длину ветви в годах

Таким образом, в неструктурной области генома 3D Т75 вошел в один кластер с представителями ВВБС и занял корневое положение совместно с Е11 и Е7. Время жизни общего предка представителей ВВБС и штамма Т75 соответствует 1938 году. Время появления ВВБС,

при анализе данной области генома, составляет 1958 г. Эти результаты достаточно близки к полученным ранее данным по участкам генома VP1 и 2C (1961 г.).

### 3.9. Анализ полногеномных последовательностей вируса везикулярной болезни свиней штамма Т75 и энтеровирусов вида В

Анализ генетического сходства полногеномных последовательностей Энтеровирусов вида В типов CV-B4, CV-B5, E30, E11, вирусов везикулярной болезни свиней и, наиболее близкого по генетической схожести в неструктурной области генома, E7 по сравнению с прототипным штаммом Т75 произведен с помощью программы SimPlot v3.5.1 [186]. Анализ показал высокий процент схожести в структурной области генома с представителями типов CV-B4 (до 85%) (Рисунок 38).

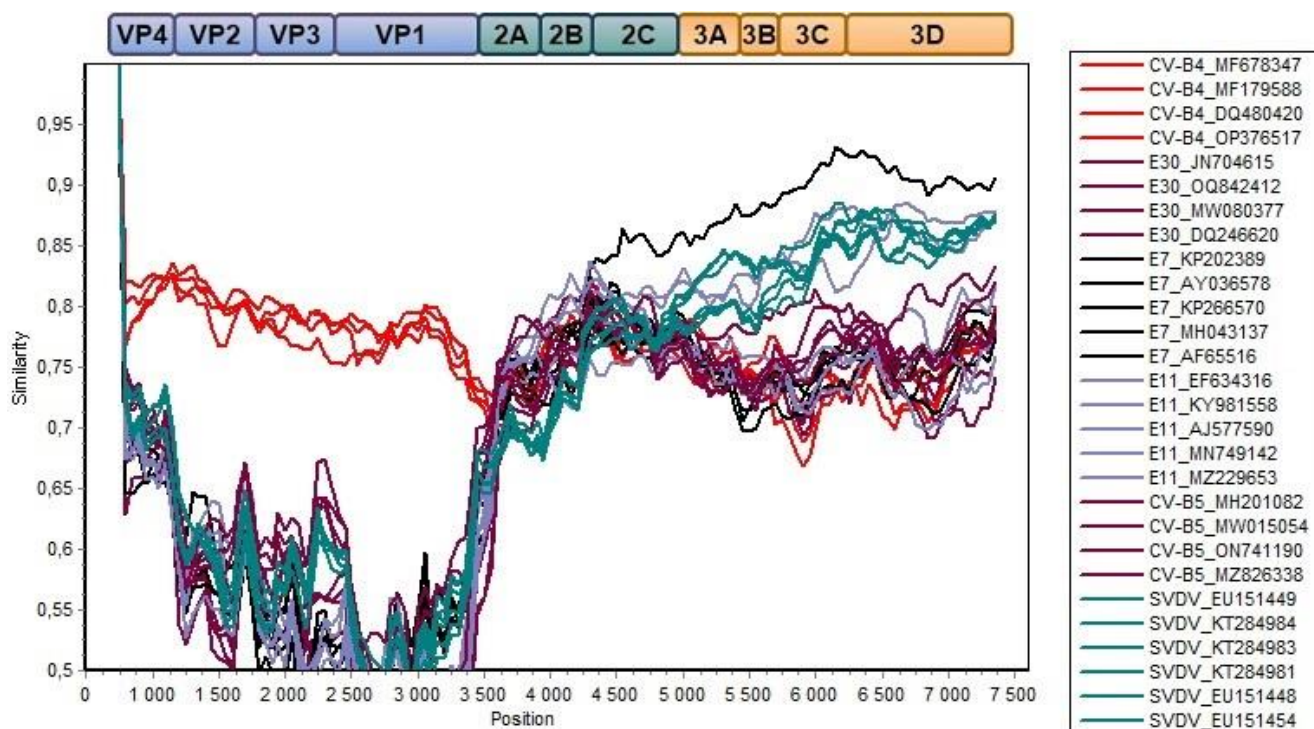


Рисунок 38 – График сходства нуклеотидных последовательностей энтеровирусов вида В и ВВБС по сравнению с исследуемым вирусом Т75, рассчитанный с помощью SimPlot v 3.5.1. Каждая точка показывает сходство между последовательностью вируса Т75 в пределах скользящего окна 500 нуклеотидов с шагом в 50 нуклеотидов. Схематическое изображение генома энтеровирусов показано сверху графика. Ось X указывает позицию в геноме, ось Y – процент схожести нуклеотидных последовательностей. Сверху показано схематическое изображение генома энтеровирусов

В неструктурной области генома наблюдается отсутствие четкого филогенетического сигнала (филогенетический шум). В области 2А - 2С все представленные вирусы имеют близкий процент схожести от 65 до 86 %. В неструктурной области генома 3А-3D четко видно, что

большой процент схожести прототипный штамм T75 имеет с E7 (онколитический вирус штамма RIGVIR номер GenBank MN043137) (до 95 %). Сходство между последовательностями выше среднего указывают на внутривидовую рекомбинацию в эволюции T75.

Бутскан-анализ представителей энтеровирусов вида В и ВВБС по сравнению с T75 показывает смену филогенетических взаимоотношений. Исследуемый штамм T75 является мозаичным рекомбинантом энтеровирусов вида В и ВВБС. В неструктурной области генома исследуемых энтеровирусов видны точки перекреста, которые соответствуют точкам рекомбинации (Рисунок 39).

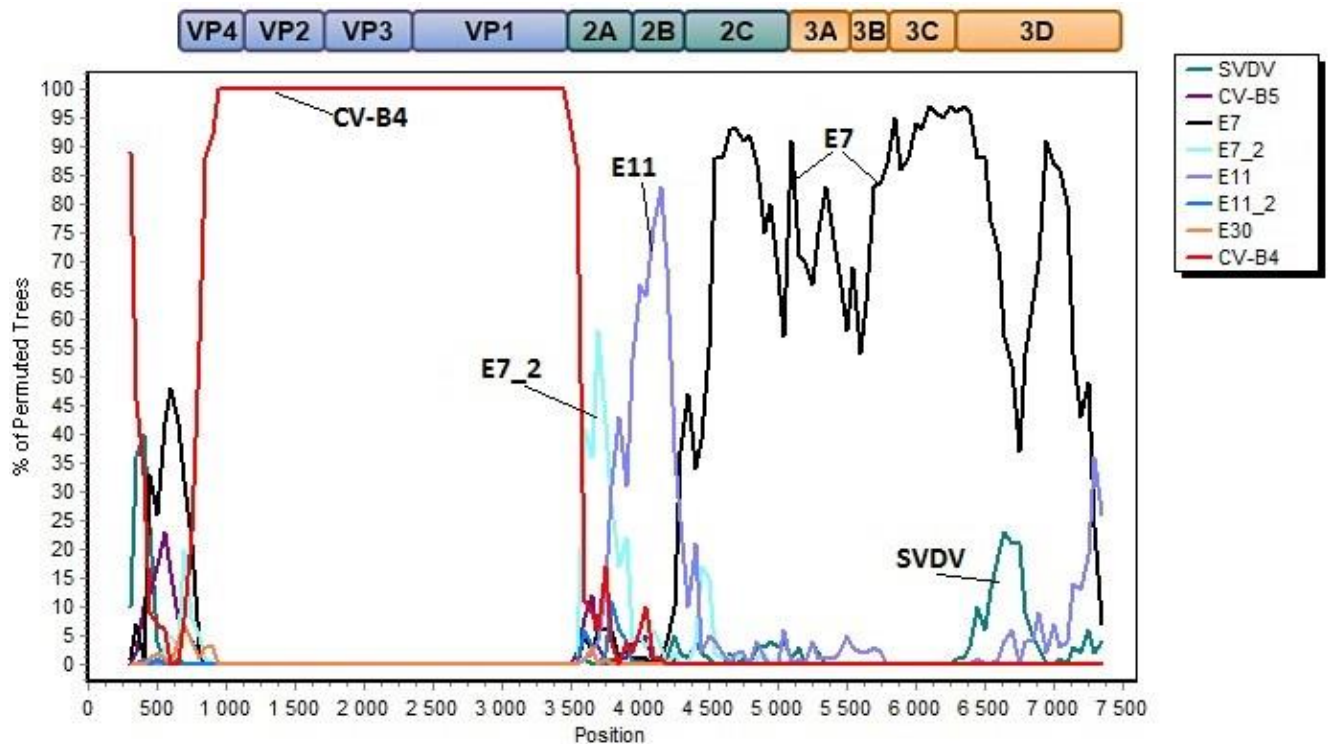


Рисунок 39 – График бутскан-анализа энтеровирусов вида В и ВВБС по сравнению с исследуемым штаммом T75, рассчитанные с помощью SimPlot v 3.5.1. График E7 соответствует одному штамму, наиболее сходному при филогенетическом анализе со штаммом T75 (MN043137), график E7\_2 – другим представителям типа E7, группа E11 – состоит из двух штаммов: AJ577590 и EF634316, E11\_2 – другим представителям типа E11. Скользящее окно 500 нуклеотидов с шагом в 50 нуклеотидов. Ось X указывает позицию в геноме, ось Y - % вероятности образования кластера на филогенетическом дереве. Сверху показано схематическое изображение генома энтеровирусов

В структурной области генома VP2-VP1 наибольший процент вероятности образования групп штамм T75 имеет с энтеровирусом типа CV-B4, что характерно для всех штаммов CV-B4. По результатам бутскан-анализа видно резкое падение вероятности группирования штамма T75 с CV-B4 в областях генома VP4, 2A-2C, что указывает на рекомбинацию, что также характерно для большинства изолятов энтеровирусов. В неструктурной области генома 2C - 3D исследуемый

штамм группируется с энтеровирусом E7 (штамм RIGVIR номер GenBank MH043137), что подтверждает данные, полученные методом филогенетического анализа.

Интересно, что межвидовой перенос CV-B4 произошел примерно в то же время, что и перенос ВВБС от CV-B5. Гипотетически, сельскохозяйственные практики, такие как использование необработанных пищевых отходов и костной муки для кормления свиней, могли способствовать межвидовой передаче двух энтеровирусов человека свиньям примерно в одно и то же время.

Интересно отметить, что классический ВВБС после своего возникновения не имел признаков рекомбинации с энтеровирусами человека ни в одном из участков генома (2С и 3D). Это указывает на то, что переход CV-B5 свиньям был единичным, односторонним и окончательным событием, после которого вирус свиней не сталкивался в одной клетке с вирусами человека. Уникальность этого события делает еще более значимым описание второго такого события на примере штамма T75, произошедшего от CV-B4.

Штамм T75 вируса CV-B4 не получил глобального распространения как патоген свиней благодаря работе ветеринарных служб в период Советского Союза, которые четко придерживались разработанных специальных инструкций и приняли все меры, чтобы не допустить распространения возбудителя и искоренить его [30]. Возможно, что тупиковая передача энтеровирусов человека другим видам встречается чаще, чем это известно в настоящее время, и два типа вируса Коксаки В, которые переключились на свиней, могут быть моделью для изучения факторов, ограничивающих эффективный межвидовой перенос энтеровирусов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомбинация генома между энтеровирусами одного вида является одной из движущих сил эволюции и причиной появления новых вариантов вирусов. Хотя межвидовая рекомбинация встречается относительно редко, внутривидовая рекомбинация среди энтеровирусов встречается часто [99,100,103].

Энтеровирусы генетически и антигенно сильно изменчивы, а рекомбинация внутри типов и между ними способствует их генетическому разнообразию. События рекомбинации у энтеровирусов чаще происходят в некапсидных областях генома, в то время как капсидная область является наиболее консервативной в плане рекомбинации для всех типов энтеровирусов [105].

Была проанализирована естественная рекомбинация в 80 штаммах энтеровирусов вида А, представленных 13 типами, путем филогенетического анализа трех участков генома: полного участка генома VP1 и частичных участков 2С и 3D [206,218,219]. Байесовское молекулярное датирование проводилось с использованием методов логнормальных расслабленных часов и моделью нуклеотидных замен SRD06.

В области генома VP1 все исследуемые штаммы группировались в соответствии с их типами. Рекомбинационных событий в структурной области энтеровирусов не обнаружено. В неструктурных областях 2С и 3D не сохранилось ни одной группы, соответствующей топологии филогенетического дерева по участку генома VP1, что указывает на множественные рекомбинационные события. Энтеровирусы типов EV-A71 и CV-A16 почти не участвуют в рекомбинации с другими типами. Представители «новых» энтеровирусов типов EV-A90, EV-A91, EV-A89 и EV-A76 не имели признаков недавней (менее 150 лет) рекомбинации с циркулирующими энтеровирусами других типов. В результате филогенетического анализа трех областей генома, мы определили три группы энтеровирусов вида А, имеющие разную частоту рекомбинации в неструктурных областях генома. «Новые» энтеровирусы, представленные типами EV-A76 и EV-A80, не вступали в рекомбинационные события ни с одним из представителей изученных в этой работе штаммов циркулирующих типов. EV-A71, CV-A16 в большинстве случаев неактивно участвовали в рекомбинации. Все секвенированные здесь изоляты CV-A16 сформировали единую филогенетическую группу без признаков рекомбинации между участками генома VP1, 2С и 3D. Об эволюционных аспектах CV-A16 в глобальном масштабе сложно судить, так как выборка была ограничена российскими штаммами. Внутри субтипов EV-A71 также не было доказательств рекомбинации. Интересно отметить, что разные субгенотипы EV-A71 легли в три разных кластера в неструктурных областях генома, что дает возможность предполагать независимую эволюцию области P2 и P3 у этих групп. Остальные

представители вирусов группы Коксаки подверглись обширной перетасовке в неструктурной области генома.

Анализ консервативных групп исследуемых энтеровирусов вида А, сохранившихся в трех областях генома VP1, 2С и 3D, показал, что количество групп было самым высоким между областями генома VP1 и 2С (28 групп) и примерно одинаковым между VP1 и 3D, а также областями 2С и 3D (18 и 17 групп соответственно) [206]. Это наблюдение противоречит опубликованным ранее сообщениям о горячей точке рекомбинации на границе структурных и неструктурных генов VP1-2А энтеровирусов и других пикорнавирусов.

Вирусы типов группы Коксаки, к которым в данном исследовании относятся CV-A2, CV-A4 и CV-A10 имели наименьшее количество сохранившихся представителей групп в участке генома 3D. Средний возраст нерекombинировавших групп данных типов составлял от 6 (CV-A4) до 8 лет (CV-A10). Период полужизни нерекombинантных форм вирусов CV-A2, CV-A4 и CV-A10 составлял от 2 до 6 лет. Все вирусы группы Коксаки, отличавшиеся больше чем на 7% нуклеотидной последовательности в каком-либо участке генома, были рекомбинантными по отношению друг к другу. EV-A71, напротив, показал замечательную генетическую стабильность. Три основных субгенотипа EV-A71 были практически полностью сохранены в трех областях генома, средний возраст жизни общего предка по участку генома VP1 от 20 лет (CV-A16 и EV-A71) до 48 лет (EV-A71) с периодом полужизни нерекombинантных форм от 18 до 28 лет в разных группах. Только пять штаммов EV-A71 в неструктурной области генома распределились по филогенетическому дереву, в то время как три группы EV-A71, в областях генома 2С и 3D, не содержали ни одной последовательности другого типа.

Несмотря на обилие различных видов энтеровирусов, лишь некоторые из них играют центральную роль в качестве частых партнеров по рекомбинации. Следовательно, мониторинг циркуляции энтеровирусов в популяции приобретает первостепенное значение.

Энтеровирусы представлены множеством генотипов, характеризуются высокой скоростью накопления мутаций и частой рекомбинацией и обладают значительным потенциалом межвидовой передачи с появлением новых инфекций. Обмен частями генома из разных родительских последовательностей может привести к высокому генетическому разнообразию и иногда может способствовать преодолению барьера вид-хозяин, как постулируется для вируса везикулярной болезни свиней, который возник из вируса CV-B5 [7,104].

Нами были получены два штамма-прототипа O72 и T75, выделенные во время вспышек в Одесской области в 1972 и Тамбовской области в 1975 годах. Впервые была определена полная нуклеотидная последовательность штамма T75 и полная нуклеотидная последовательность области генома белка VP1 штамма O72, вызывающие ВБС [98]. Байесовский филогенетический анализ с методом молекулярного датирования этих образцов с образцами из GenBank, позволил

установить, что вирус Т75 произошел от человеческого вируса типа CV-B4. Ранние исследования предполагали, что все вирусы ВБС произошли от CV-B5 [30]. Все вирусы везикулярной болезни свиней группировались в отдельный кластер с предполагаемым временем появления общего предка в 1961 году (95% ДИ 1959–1963 гг.), а от ближайших CV-B5 они отделились после 1952 года (95% ДИ 1946–1957 гг.). Было установлено, что общий предок штамма Т75 и вирусов CV-B4, вошедших в одну группу по области генома, кодирующего структурный белок VP1, появился около 1950 г. (95% ДИ 1945–1953 гг.) [98]. Филогенетический анализ областей генома, кодирующих белки 2С и 3D прототипного штамма Т75 и других представителей энтеровирусов вида В показал, что в области генома 2С исследуемый штамм группируется с E7 (штамм RIGVIR номер GenBank MN043137) и значительно отличается от ВБС. В области генома белка 3D Т75 вместе с E11 и E7 заняли базальное положение в кластере ВБС, tMRCA их соответствует 1939 году. Интересно отметить, что в трех областях генома, предполагаемые даты появления ВБС сопоставимы – 1961 год для областей генома белков VP1 и 2С; 1959 год для области 3D.

При анализе полных геномов энтеровирусов вида В и Т75 было установлено, что штамм Т75 является мозаичным рекомбинантом. Полученные данные свидетельствуют о том, что множественные события рекомбинации играли роль в эволюции штамма Т75. Данные результаты подтверждают наше утверждение, что нужно рассматривать энтеровирусы не по отдельным типам, а как облако генетической информации.



## ВЫВОДЫ

1. Частота естественной рекомбинации у неполиомиелитных энтеровирусов вида А значительно различается у разных типов. Большая часть типов энтеровирусов этого вида участвует в рекомбинации часто, но типы EV-A71 и CV-A16 вовлечены в рекомбинацию в значительно меньшей степени. «Новые» представители вида – энтеровирусы EV-A76 и EV-A90 – не рекомбинируют с основными типами.

2. Время полужизни циркулирующего вируса без признаков рекомбинации составляет от 2 лет у CV-A2, CV-A4 и CV-A10 и до 28 лет у EV-A71. Для большинства типов энтеровирусов вида А время циркуляции до 50% вероятности участия в рекомбинации соответствовало интервалу 2-6 лет.

3. Частота рекомбинации энтеровирусов вида А между участками генома 2С и 3D не ниже, чем в известной ранее «горячей точке» рекомбинации между участками генома VP1 и 2С.

4. Возникновение нового энтеровируса свиней (ВВБС), вызвавшего эпизоотию в Советском Союзе в 1975 (штамм Т75), произошло в период с 1945 по 1975 гг. в результате второго межвидового перехода вируса CV-B4 от человека к свиньям, независимого от возникновения классического варианта ВВБС в результате межвидового перехода вируса CV-B5 от человека.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

В настоящее время филогенетические и биоинформатические инструменты постоянно совершенствуются, однако отсутствует достаточное количество полных геномов циркулирующих штаммов, что затрудняет изучение рекомбинации и межвидового перехода энтеровирусов. Для изучения эволюционных процессов энтеровирусов и появления вирусов с новыми свойствами недостаточно только структурной области генома VP1. Так как энтеровирусы представляют собой пул генетической информации, необходимо изучение всех областей геномов для точной оценки роли рекомбинации в эволюции вирусов. Для полной картины требуется рутинное секвенирование полных геномов энтеровирусов человека и животных, а также эпиднадзор в регионах, которым в настоящее время не уделяется должное внимание. Партнёрство между лабораториями разных округов также крайне важно для обеспечения равномерного охвата выборки и качества данных.

Межвидовые переносы ВВБС от CV-B4 и CV-B5 произошли примерно в одно и то же время (между 1945 и 1975 гг.), когда начался подъем сельскохозяйственного производства в Советском Союзе. В то время организация кормления и содержание свиней была на низком уровне - для кормления использовали отходы промышленности, перерабатывающей продукты сельского хозяйства, что могло содействовать межвидовой передаче энтеровирусов. Необходимо не допускать нарушения норм кормления и норм содержания сельскохозяйственных животных.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Важной задачей дальнейшего изучения механизма возникновения энтеровирусов является необходимость расширенных исследований для обнаружения рекомбинантных форм. Будет продолжена работа по идентификации и филогенетическому анализу энтеровирусов разных видов в разных областях генома.

Энтеровирусы животных находятся в тесном генетическом и экологическом взаимодействии с энтеровирусами человека. Для понимания происхождения человеческих энтеровирусов необходимо изучать разнообразие и эволюцию нечеловеческих энтеровирусов. Одним из направлений дальнейших исследований будет изучение энтеровирусов животных, чтобы определить, могли ли быть другие, пока что неизвестные случаи преодоления межвидового барьера энтеровирусами человека. Каждый случай межвидовой передачи важен для оценки потенциала энтеровирусов как источника новых заболеваний.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

3' НТО	– 3' нетранслируемая область
5' НТО	– 5' нетранслируемая область
ВВБС	– Вирус везикулярной болезни свиней
ВБС	– Везикулярная болезнь свиней
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ДИ	– Доверительный интервал
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– Желудочнокишечный тракт
ИПВ	– Инактивированная полиомиелитная вакцина
НПЭВ	– Неплиомиелитные энтеровирусы
ОПВ	– Оральная (живая) полиомиелитная вакцина
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	– Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК	– Рибонуклеиновая кислота
СК	– Сиаловая кислота
СНГ	– Содружество Независимых Государств
УФ	– Ультрафиолет
ЦНС	– Центральная нервная система
ЦПД	– Цитопатическое действие
BEAST	– Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees, деревья выборки байесовского эволюционного анализа
CAR	– Chimeric antigen receptor, химерный рецептор антигена
CD55	– Complement decay-accelerating factor, фактор ускорения распада комплемента
CL	– Cloverleaf, структура клеверного листа
Ct	– Threshold cycle, значение порогового цикла
ECHO	– Enteric Cytopathic Human Orphan, кишечно-цитопатическая орфанная болезнь человека
ESS	– Effective Sample Size, эффективный размер выборки
EV	– Enterovirus, энтеровирус
FAM	– Carboxyfluorescein, карбоксифлуоресцеин
HFMD	– Hand, foot and mouth disease, заболевание рука-нога-рот

HKY	– Hasegawa-Kishino-Yano, Хасэгава-Кисино-Яно
ICAM-1	– Inter-Cellular Adhesion Molecule-1, молекулу межклеточной адгезии-1
ICTV	– International Committee on Taxonomy of Viruses, международный комитет по таксономии вирусов
IRES	– Internal ribosome entry site, внутренний сайт посадки рибосом
KREMEN1	– Kringle Containing Transmembrane Protein 1, Крингл, содержащий трансмембранный белок 1
MCL	– Maximum Composite Likelihood, максимальное составное правдоподобие
MCMC	– Markov chain Monte Carlo, Монте-Карло для марковских цепей
MEM	– Minimum Essential Medium, минимальная основная среда
NCL	– Nucleolin, нуклеолин
NRP1	– Neuropilin 1, нейропилин 1
ORF	– Open Reading Frame, открытая рамка считывания
PSGL-1	– P-selectin glycoprotein ligand-1, Р-селектиновый гликопротеиновый лиганд-1
PVR	– The human poliovirus receptor, рецептор полиовируса человека
RD	– Rhabdomyosarcoma, рабдомиосаркома человека
RNA	– Ribonucleic acid, рибонуклеиновая кислота
SCRAB-2	– Scavenger receptor class B type 2, лизосомальный интегральный мембранный белок 2
SVDV	– Swine Vesicular Disease Virus, вирус везикулярной болезни свиней
T <sub>m</sub>	– Melting Temperature, температура отжига праймеров
tMRCA	– Most recent common ancestor, возраст ближайшего общего предка

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simmonds, P. Frequency and Dynamics of Recombination within Different Species of Human Enteroviruses / P. Simmonds, J. Welch. // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – № 1. – P. 483–493. – DOI: 10.1128/JVI.80.1.483-493.2006.
2. Yarmolskaya, M.S. Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 30 in Russia: Different properties of genotypes within an enterovirus serotype / M.S. Yarmolskaya, E.Yu. Shumilina, O.E. Ivanova, J.F. Drexler, A.N. Lukashev. // *Infect. Genet. Evol.* – 2015. – Vol. 30. – P. 244–248. – DOI: 10.1016/j.meegid.2014.12.033.
3. Lindberg, A.M. Evolution of the genome of Human enterovirus B: Incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species / A. M. Lindberg, P. Andersson, C. Savolainen, M.N. Mulders, T. Hovi. // *J. Gen. Virol.* – 2003. – Vol. 84. – № 5. – P.1223–1235. – DOI: 10.1099/vir.0.18971-0.
4. Oberste, M.S. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): Genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation / M.S. Oberste. // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – № 12. – P. 3928–3933. – DOI: 10.1128/JCM.37.12.3928-3933.1999.
5. Lukashev, A.N. Recombination in Circulating Enteroviruses / A.N. Lukashev, V.A. Lashkevich, O.E. Ivanova, G.A. Koroleva [et al.]. // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77 – № 19. – P. 10423–10431. – DOI: 10.1128/jvi.77.19.10423-10431.2003.
6. McIntyre, C.L. Analysis of Genetic Diversity and Sites of Recombination in Human Rhinovirus Species C / C.L. McIntyre, E.C. McWilliam Leitch, C. Savolainen-Kopra, T.Hovi [et al.]. // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – № 19. – P. 10297–10310. – DOI: 10.1128/JVI.00962-10.
7. Zhang, G. Molecular evolution of swine vesicular disease virus / G. Zhang, D.T. Haydon, N.J. Knowles, J.W. McCauley // *J. Gen. Virol.* – 1999. – Vol. 80. – № 3. – P. 639–651. – DOI: 10.1099/0022-1317-80-3-639.
8. Graves, J.H. Serological relationship of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus / J.H. Graves // *Nature.* – 1973. – Vol. 245. – № 5424. – P. 314–315. DOI: 10.1038/245314a0.
9. Zhang, G. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus / G. Zhang, G. Wilsden, N.J. Knowles, J.W. McCauley // *J. Gen. Virol.* – 1993. – Vol. 74. – № 5. – P. 845–853. – DOI: 10.1099/0022-1317-74-5-845.
10. Moonen, P. Singleton reactors in the diagnosis of swine vesicular disease: the role of

coxsackievirus B5 / P. Moonen, F. Van Poelwijk, R. Moormann, A. Dekker // *Vet. Microbiol.* – 2000. – Vol. 76. – P. 291–297. – DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00239-x.

11. Zell, R. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae / R. Zell, E. Delwart, A.E. Gorbalenya, T. Hovi [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98. – № 10. – P. 2421–2422. – DOI: 10.1099/jgv.0.000911.

12. Paul, J.R. A history of poliomyelitis. / J.R. Paul // New Haven & London: Yale Univ, Press. – 1971. – P. 1-486.

13. Knipe, D.M. Fields virology / D.M. Knipe, P.M. Howley. // Lippincott Williams & Wilkins, – 2007. – P. 839–894.

14. Киселев, О.И. Вопросы общей вирусологии: Учебное пособие. О.И. Киселев, И.Н. Жилинский // Санкт-Петербург. – 2007. – С. 1-374.

15. Заславская, М.И. Вирус Полиомиелита / М.И. Заславская // Вопросы Диагностики В Педиатрии. – 2010. – № 2. – С. 6–11.

16. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000 Электронный ресурс. – 1988. – URL: [https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/WHA41\\_R28\\_rus.pdf](https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/WHA41_R28_rus.pdf) (дата обращения 20.03.2024).

17. Wolbert, J.G. Poliomyelitis/ J.G. Wolbert, K. Higginbotham. // StatPearls Publishing, – 2022. – P. 1-202. – DOI: 10.1136/pgmj.72.853.641.

18. Демина, А.В., Энтеровирусы. Часть 1: история открытия, таксономия, строение генома, эпидемиология / А.В. Демина, Н.А. Маркович, С.В. Нетесов // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – №1. – С. 1-129.

19. Melnick, J.L. Ohio strains of a virus pathogenic for infant mice, Coxsackie group; simultaneous occurrence with poliomyelitis virus in patients with summer grippe. / J.L. Melnick, N. Ledinko // *J. Exp. Med.* – 1950. – P. 1-11. – DOI: 10.1084/jem.91.2.185.

20. Robbins, F.C. Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis./ F.C. Robbins, J.F. Enders, T.H. Weller, G.L. Florentino. // *Am J Hyg.* – 1951. – Vol. 54. – № 2. – P. 86-93. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119486.

21. Melnick, J.L. Poliomyelitis and Coxsackie viruses isolated from normal infants in Egypt / J.L. Melnick, K. Agren // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1952. – № 81. – P. 621–624. – DOI: 10.3181/00379727-

81-19964.

22. Dalldorf, G. Enteric Cytopathogenic Human Orphan (ECHO) Viruses / G. Dalldorf, J. Enders, W. Hammon, A. Sabin [et al.]. // *Science*. – 1955. – Vol. 122. – № 3181. – P. 1187–1188.
23. Johnson, R.T. Epidemic central nervous system disease of mixed enterovirus etiology: clinical and epidemiologic description / R.T. Johnson, H.E. Shuey, E.L. Buescher // *Am. J. Epidemiol.* – 1960. – Vol. 71. – № 3. – P. 321–330. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120116.
24. Oberste, M.S. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A / M. Steven Oberste, Kaija Maher, Suzanne M. Michele, Gaël Belliot, Moyez Uddin, Mark A. Pallansch // *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 86. – № 2. – P. 445–451. – DOI: 10.1099/vir.0.80475-0.
25. Knowles, N.J. Family - Picornaviridae / N.J. Knowles, T. Hovi, T. Hyypia, A.M.Q. King [et al.]. // *Virus Taxon. Ninth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses.* – 2012. – Vol. 6. – P. 855–881.
26. Демина, А.В. Энтеровирусы. Часть 2. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений / А.В. Демина, С.В. Нестеров // *Бюллетень СО РАМН.* – 2009. – №6 – P. 116–125.
27. Melnick, J.L. Identification of Bulgarian Strain 258 of Enterovirus 71 / J.L. Melnick, N.J. Schmidt, R.R. Mirkovic, M.P. Chumakov, I.K. Lavrova, M.K. Voroshilova // *Intervirology.* – 1979. – Vol. 12. – № 6. – P. 297–302. – DOI: 10.1159/000149088.
28. Jubelt, B. Enterovirus/Picornavirus infections / B. Jubelt, H.L. Lipton // *Handbook of Clinical Neurology.* 1st ed. Elsevier B.V., – 2014. – № 123. –P. 379–416. – DOI: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00018-3.
29. Nardelli, L. A Foot and Mouth Disease Syndrome in Pigs caused by an Enterovirus /. L. Nardelli, E. Lodetti, G.L. Gualandi, R. Burrows [et al.]. // *Nature.* – 1968. – Vol. 219. – № October 1966 – P. 1275–1276. – DOI: 10.1038/2191275a0.
30. Bruhn, C.A. Viral meningitis epidemics and a single, recent, recombinant and anthroponotic origin of swine vesicular disease virus / C.A. Bruhn, S.C. Nielsen, J.A. Samaniego, J. Wadsworth [et al.]. // *Evol. Med. Public Heal.* – 2015. – Vol. 2015. – № 1. – P. 289–303. – DOI: 10.1093/emph/eov026.
31. Fieldhouse, J.K. A systematic review of evidence that enteroviruses may be zoonotic / J.K. Fieldhouse, X. Wang, K.A. Mallinson, R.W. Tsao [et al.]. // *Emerg. Microbes Infect.* Springer US, – 2018. – Vol. 7 – № 1. – P. 1–9. – DOI: 10.1038/s41426-018-0159-1.

32. Dekker, A. Swine vesicular disease, studies on pathogenesis, diagnosis, and epizootiology / A. Dekker // *Vet Q.* – 2000. – Vol. 22. – № 4. – P. 189–192. – DOI: 10.1080/01652176.2000.9695055.
33. Lu, H. A novel interspecies recombinant enterovirus (Enterovirus A120) isolated from a case of acute flaccid paralysis in China / H. Lu, M. Hong, Y. Zhang, J. Xiao [et al.]. // *Emerg. Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 9. – P. 1733–1743. – DOI: 10.1080/22221751.2020.1796527.
34. Greninger, A.L. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the United States from 2012–2014: a retrospective cohort study / A.L. Greninger, S.N. Naccache, K. Messacar, A. Clayton [et al.]. // *Physiol. Behav.* – 2015. – Vol. 15. – № 6. – P. 671–682. – DOI: 10.1016/S1473-3099(15)70093-9.
35. Sun, J. Current understanding of human enterovirus D68 / J. Sun, X.Y. Hu, X.F. Yu. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 6. – № 11. – P. 490–503. – DOI: 10.3390/v11060490.
36. Lukashev A.N. et al. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? / A.N. Lukashev, Y.A. Vakulenko, N.A. Turbabina, A.A. Deviatkin, J.F. Drexler // *Rev. Med. Virol.* – 2018. – Vol. 28. – № 6. – P. 1–10. – DOI: 10.1002/rmv.2002.
37. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford) Электронный ресурс. – 2020. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=12058/> (дата обращения 12.05.2021).
38. Baggen, J. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it / J. Baggen, H. J. Thibaut, J. Strating, F. J. Kuppeveld. // *Nat. Rev. Microbiol.* Springer US, – 2018. – Vol. 16. – № 6. – P. 368–381. – DOI: 10.1038/s41579-018-0005-4.
39. Jiang, P. Picornavirus Morphogenesis / P. Jiang, Y. Liu, H.C. Ma, A.V. Paul [et al.]. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2014. – Vol. 78 – № 3. – P. 418–437. – DOI: 10.1128/MMBR.00012-14.
40. Простова, М.А. Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента og1L генома полиовируса: диссертация канд. биол. наук: 03.02.02 / Простова Мария Александровна. -Москва, 2017.–114 с.
41. ViralZone SIB Swiss Institute of Bioinformatics Электронный ресурс. – 2019. – URL: <https://viralzone.expasy.org/97> (дата обращения 15.05.2021).
42. Лукашев, А.Н. Роль рекомбинации в эволюции неполиомиелитных энтеровирусов:



диссертация док. мед. наук: 03.02.02 / Лукашев Александр Николаевич. -Москва, 2006. –153 с.

43. Pestova, T. V. Conserved AUG Triplet in the 5' Nontranslated Region of Poliovirus Can Function as an Initiation Codon in Vitro and in Vivo / T. V. Pestova, C.U.T. Hellen, E. A Wimmer. // *Virology*. – 1994. – Vol. 204. – № 2. – P. 729-737. – DOI: 10.1006/viro.1994.1588.
44. Nikonov, O.S. Enteroviruses: Classification, diseases they cause, and approaches to development of antiviral drugs / O.S. Nikonov, E.S. Chernykh, M.B. Garber, E.Y. Nikonova. // *Biochem.* – 2017. – Vol. 82. – № 13. –P. 1615–1631. – DOI: 10.1134/S0006297917130041.
45. Pallansch, M.A. Protein processing map of poliovirus / M.A. Pallansch, O.M. Kew, B.L. Semler, D.R. Omilianowski [et al.]. // *J. Virol.* – 1984. –Vol. 49. – № 3. –P. 873–880. – DOI: 10.1128/JVI.49.3.873-880.1984.
46. Dorsch-Häsler, K. Replication of picornaviruses. I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly(A) of the poliovirus genome is genetically coded / K. Dorsch-Häsler, Y. Yogo, E. Wimmer. // *J. Virol.* –1975. – Vol. 16. – № 6. –P. 1512-1517. – DOI: 10.1128/JVI.16.6.1512-1517.1975.
47. Yogo, Y. Poly (A) and Poly (U) in poliovirus double stranded RNA / Y. Yogo, E. Wimmer // *Nat. New Biol.* –1973. – Vol. 242. – № 119. –P. 171–174. – DOI: 10.1038/newbio242171a0.
48. Trono, D. Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region / D. Trono, J. Pelletier, N. Sonenberg, D. Baltimore. // *Science* – 1988. –Vol. 241. – № 4864. –P. 445–448. DOI: 10.1126/science.2839901.
49. Pilipenko, E. V. Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: A quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions / E. V. Pilipenko, K. V. Poperechny, S. V. Maslova, W. J. Melchers [et al.]. // *EMBO J.* –1996. –Vol. 15. –№ 19. –P. 5428–5436.
50. Smyth, M.S. Picornavirus uncoating / M.S. Smyth, J.H. Martin // *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* – 2002. – Vol. 55. – № 4. – P. 214-219. – DOI: 10.1136/mp.55.4.214.
51. Racaniello, V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis / V.R. Racaniello // *Virology*. – 2006. – Vol. 344. – № 1. –P. 9-16. – DOI: 10.1016/j.virol.2005.09.015.
52. Шишко, Л.А. Вирусологическая характеристика энтеровирусов и особенности эпидемического процесса энтеровирусной инфекции: диссертация канд. мед. наук: 03.02.02 / Шишко Лариса Александровна. – Санкт-Петербург, 2017. –152 с.

53. Andino, R. Intracellular determinants of picornavirus replication / R. Andino, N. Böddeker, D. Silvera, A. V. Gamarnik. // *Trends Microbiol.* – 1999. – Vol. 7, – № 2. – P. 76–82. – DOI: 10.1016/s0966-842x(98)01446-2.
54. Muslin, C. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process / C. Muslin, A. M. Kain, M. Bessaud, B. Blondel, F. Delpyroux. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 1–30. – DOI: 10.3390/v11090859.
55. Rossmann, M.G., Picornavirus-receptor interactions / M.G. Rossmann, Y. He, R.J. Kuhn. // *Trends Microbiol.* – 2002. – Vol. 10. – № 7. – P. 324–331. – DOI: 10.1016/s0966-842x(02)02383-1.
56. Белалов, И.Ш. Естественная рекомбинация у пикорнавирусов: диссертация канд. биол. наук: 03.02.02 / Белалов Илья Шамильевич. – Москва, 2011. – 84 с.
57. Basavappa, R. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution / R. Basavappa, R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle [et al.]. // *Protein Sci.* – 1994. – Vol. 3. – № 10. – P. 1651–1669. – DOI: 10.1002/pro.5560031005.
58. Wells, A.I. Enteroviruses: A gut-wrenching game of entry, detection, and evasion / A.I. Wells, C.B. Coyne // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. – № 5. – P. 1–20. – DOI: 10.3390/v11050460.
59. Racaniello, V.R. Early events in poliovirus infection: Virus-receptor interactions / V.R. Racaniello // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – Vol. 93. – № 21. P. 11378–11381. – DOI: 10.1073/pnas.93.21.11378.
60. Nishimura, Y. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 / Y. Nishimura, M. Shimojima, Y. Tano, T. Miyamura [et al.]. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15. – № 7. – P. 794–797. – DOI: 10.1038/nm.1961.
61. Tuthill, T.J. Picornaviruses / T.J. Tuthill, E. Groppe, J.M. Hogle, D.J. Rowlands. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2010. – Vol. 343. – P. 43–89. – DOI: 10.1007/82\_2010\_37.
62. Xiao, C. Interaction of Coxsackievirus A21 with Its Cellular Receptor, ICAM-1 / C. Xiao, C.M. Bator, V.D. Bowman, E. Rieder [et al.]. // *J Virol.* – 2001. – Vol. 75. – № 5. – P. 2444–2451. – DOI: 10.1128/JVI.75.5.2444-2451.2001.
63. Yamayoshi, S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 / S. Yamayoshi, Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, Takashi Minowa [et al.]. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15. – № 7. – P.

798–801. – DOI: 10.1038/nm.1992.

64. Bergelson, J.M. Infection by Echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2/ J.M. Bergelson, N.S. John, S. Kawaguchi, M. Chan [et al.]. // *J Virol.* – 1993. – Vol. 67. – № 11. – P. 6847–6852. – DOI: 10.1128/JVI.67.11.6847-6852.1993.

65. He, Y. Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7 : A virus-receptor complex/ Y. He, F. Lin, P.R. Chipman, C.M. Bator [et al.]. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99. – № 16. – P. 10325–10329. – DOI: 10.1073/pnas.152161599.

66. Ward, T. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS , a rapid immuno-focal cloning method / T. Ward, P.A. Pipkin, N.A. Clarkson, D.M. Stone [et al.]. // *EMBO J.* – 1994. – Vol. 13. – № 21. –P. 5070–5074. – DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06836.x.

67. Williams, C.H. Integrin  $\alpha v \beta 6$  Is an RGD-Dependent Receptor for Coxsackievirus A9/ C.H. Williams, T. Kajander, T. Hyypiä, T. Jackso [et al.]. // *J Virol.* – 2004. – Vol. 78. – № 13. – P. 6967–6973. – DOI: 10.1128/JVI.78.13.6967-6973.2004.

68. Shakeel, S. Structural and Functional Analysis of Coxsackievirus A9 Integrin  $\alpha\beta 6$  Binding and Uncoating./ S. Shakeel, J. T. Seitsonen, T. Kajander, P. Laurinmäki [et al.]. // *Journal of Virology.* – 2013. – Vol. 87. – № 7. – P. 3943–3951. – DOI: 10.1128/JVI.02989-12.

69. Zhou, D. Unexpected mode of engagement between enterovirus 71 and its receptor SCARB2 / D. Zhou, Y. Zhao, A. Kotecha, E.E. Fry [et al.]. // *Nat. Microbiol.* – 2019. – Vol. 4. – P. 414-419. – DOI: 10.1038/s41564-018-0319-z.

70. Yamayoshi, S. Receptors for enterovirus 71 / S. Yamayoshi, K Fujii., S. Koike. // *Emerg. Microbes Infect.* – 2014. – Vol. 3. – № 7. – P. 1-7. – DOI: 10.1038/emi.2014.49.

71. Yang, S.-L. Annexin II Binds to Capsid Protein VP1 of Enterovirus 71 and Enhances Viral Infectivity / S.-L. Yang, Y.-T. Chou, C.-N. Wu, M.-S. Ho. // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85. – № 22. – P. 11809–11820. – DOI: 10.1128/JVI.00297-11.

72. Nilsson, E.C. Sialic Acid Is a Cellular Receptor for Coxsackievirus A24 Variant, an Emerging Virus with Pandemic Potential / E.C. Nilsson, F. Jamshidi, S.M.C. Johansson, M.S. Oberste [et al.]. // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82. – № 6. – P. 3061–3068. – DOI: 10.1128/JVI.02470-07.

73. Du, N. Cell Surface Vimentin Is an Attachment Receptor for Enterovirus 71 / N. Du, H. Cong, H.

Tian, H. Zhang [et al.]. // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88. – № 10. – P. 5816–5833. – DOI: 10.1128/JVI.03826-13.

74. Su, P.-Y. Cell Surface Nucleolin Facilitates Enterovirus 71 Binding and Infection / P.-Y. Su, Y.-F. Wang, S.-W. Huang, Y.-C. Lo [et al.]. // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89. – № 8. – P. 4527–4538. – DOI: 10.1128/JVI.03498-14.

75. Wang, H.-C. Effect of a Neuropilin-1-Derived Virus Receptor Trap on Enterovirus A71 Infection in Vitro / H.-C. Wang, P.-N. Huang, H.-C. Hung, S.-N. Tseng [et al.]. // *Am. Soc. Microbiol.* – 2020. – № 10. – P. 1–8. – DOI: 10.1128/AAC.00695-20.

76. Zhang, X. The binding of a monoclonal antibody to the apical region of SCARB2 blocks EV71 infection / X. Zhang, P. Yang, N. Wang, J. Zhang [et al.]. // *Protein Cell.* – 2017. – Vol. 8. – P. 590-600. – DOI: 10.1007/s13238-017-0405-7.

77. He, Y. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus./ Y. He, V.D. Bowman, S. Mueller, C.M. Bator, S.-N. Tseng [et al.]. // *PNAS.* – 2000. – Vol. 97. – № 1. – P. 79–84. – DOI: 10.1073/pnas.97.1.79

78. Baggen, J. Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus./ J. Baggen, D.L. Hurdiss, G. Zocher, N. Mistry [et al.]. // *PNAS.* – 2018. – Vol. 115. – № 2. – P.397-402. – DOI: 10.1073/pnas.1713284115.

79. Bubeck, D. Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus- receptor-membrane complex Doryen / D. Bubeck, D.J. Filman, J.M. Hogle. // *NIH Public Access.* – 2005. – Vol. 12. – № 7. – P. 615–618. – DOI: 10.1038/nsmb955.

80. Organtini, L.J. Kinetic and Structural Analysis of Coxsackievirus B3 Receptor Interactions and Formation of the A-Particle / L.J. Organtini, A.M. Makhov, J.F. Conway, S. Hafenstein [et al.]. // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88. – № 10. – P. 5755–5765. – DOI: 10.1128/JVI.00299-14.

81. Strauss, M. Nectin-Like Interactions between Poliovirus and Its Receptor Trigger Conformational Changes Associated with Cell Entry / M. Strauss, D.J. Filman, D.M. Belnap, N. Cheng [et al.]. // *J Virol.* – 2015. Vol. – 89. – № 8. – P. 4143–4157. – DOI: 10.1128/JVI.03101-14.

82. Zhang, P. Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses / P. Zhang, S. Mueller, M.C. Morais, C.M. Bator [et al.]. // *PNAS.* – 2008. – Vol. 105. – P. 18284-18289. – DOI: 10.1073/pnas.0807848105.

83. Ackermann, W.W. Cationic modulation of the inactivation of poliovirus by heat / W.W. Ackermann, R.S. Fujioka, H.B. Kurtz. // *Arch. Environ. Health.* – 1970. – Vol. 21. – № 3. – P. 377–381. – DOI: 10.1080/00039896.1970.10667254.
84. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции // МУ 3.1.1.2363-08. 2008. 1–54 p.
85. Демина, А.В. Энтеровирусы. Часть 3. Лабораторная диагностика, лечение, иммунопрофилактика и профилактические мероприятия в очаге // *Бюллетень ВШЦ СО РАМН.* 2011. – Vol. 3. – P. 115–122.
86. Ivanova, O.E. Environmental surveillance for poliovirus and other enteroviruses: Long-term experience in Moscow, Russian Federation, 2004-2017 / O.E. Ivanova, M.S. Yarmolskaya, T.P. Eremeeva, G.M. Babkina [et al.]. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. – № 5. – P. 1–13. – DOI: 10.3390/v11050424.
87. Chang, L. Neurodevelopment and Cognition in Children after Enterovirus 71 Infection / L.-Y. Chang, L.-M. Huang, S. Gau, Y.-Y. Wu [et al.]. // *The new Engl. J. of Med.* – 2007. – Vol. 356. – P. 1226–1234. – DOI: 10.1056/NEJMoa065954.
88. Faleye, T.O.C., Defining the enterovirus diversity landscape of a fecal sample: A methodological challenge? / T.O.C. Faleye, M.O. Adewumi, J.A. Adeniji. // *Viruses.* –2016. – Vol. – 8. – № 1. –P. 1–11. – DOI: 10.3390/v8010018.
89. Mallia, P. Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation / P. Mallia, S.D. Message, V. Gielen, M. Contoli [et al.]. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 183. – № 6. – P. 734–742. – DOI: 10.1164/rccm.201006-0833OC.
90. Dahourou, G. Genetic recombination in wild-type poliovirus / G. Dahourou, S. Guillot, O.L. Gall, R. Crainic. // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – № 12. – P. 3103–3110. – DOI: 10.1099/0022-1317-83-12-3103.
91. Mueller, S. Poliovirus and poliomyelitis : A tale of guts , brains , and an accidental event / S. Mueller, E. Wimmer, J. Cello. // *Virus Res.* – 2005. – Vol. 111. – P. 175-193. – DOI: 10.1016/j.virusres.2005.04.008.
92. Yang, F. Enterovirus 71 outbreak in the People’s Republic of China in 2008 / F. Yang, L. Ren, Z. Xiong, J. Li [et al.]. // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – № 7. – P. 2351–2352. – DOI: 10.1128/JCM.00563-09.

93. Pons-Salort, M. The epidemiology of non-polio enteroviruses: Recent advances and outstanding questions / M. Pons-Salort, E.P.K. Parker, N.C. Grassly. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* –2015. – Vol. 28. – №5. – P. 479-487. – DOI: 10.1097/QCO.0000000000000187.
94. Muehlenbachs, A. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection // A. Muehlenbachs, J. Bhatnagar, S.R. Zaki. // *J. Pathol.* – 2015. – Vol. 235 – №2. – P. 217-228. – DOI: 10.1002/path.4438.
95. Ngangas, S.T. Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016-2017 / S.T. Ngangas, A. Lukashev, G. Jugie, O. Ivanova [et al.]. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 2016–2017. – DOI: 10.3201/eid2506.181460.
96. Лашкевич, В.А. Энттеровирус 71 - Ящуроподобное Заболевание, Энцефаломиелит, Острый Отек Легких (2011) / В.А. Лашкевич, Г.А. Королева, А.Н. Лукашев, В.Я. Кармышева [и др.] // *Эпидемиология И Инфекционные Болезни* . – 2011. – P. 38–47.
97. Alexander, J.P. Enterovirus 71 Infections and Neurologic Disease — United States , 1977 – 1991 / J.P. Alexander, L. Baden, M.A. Pallansch, L.J. Anderson. // *J Infect Dis.* – 1994. – Vol. 169. – № 4. – P. 905-908. – DOI: 10.1093/infdis/169.4.905.
98. Lomakina, N.F. Epizootic of vesicular disease in pigs caused by coxsackievirus B4 in the Soviet Union in 1975 / N.F. Lomakina, E.Y. Shustova, O.M. Strizhakova, J.F. Drexler [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2016. – Vol. 97. – № 1. – P. 49–52. – DOI: 10.1099/jgv.0.000318.
99. Leitch, E.C.M. Evolutionary Dynamics and Temporal / Geographical Correlates of Recombination in the Human Enterovirus Echovirus Types 9 , 11 , and 30. / E.C.M. Leitch, M. Cabrerizo, J. Cardoso, H. Harvala [et al.]. // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84. – № 18. – P. 9292–9300. – DOI: 10.1128/JVI.00783-10.
100. Leitch, E.C.M. The Association of Recombination Events in the Founding and Emergence of Subgenogroup Evolutionary Lineages of Human // E.C.M. Leitch, M. Cabrerizo, J. Cardoso, H. Harvala [et al.]. // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86. – № 5. – P. 2676–2685. – DOI: 10.1128/JVI.06065-11.
101. Mirand, A. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: A large citywide, prospective observational study / A. Mirand, C. Henquell, C. Archimbaud, S. Ughetto [et al.]. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 110-118. – DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x.
102. Van der Sanden, S. Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus

- 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963-2010 / S. van der Sanden, J. van Eek, D.P. Martin, H. van der Avoort [et al.]. // *Infect. Genet. Evol.* Elsevier B.V. – 2011. – Vol. 11. – № 5. – P. 886–894. – DOI: 10.1016/j.meegid.2011.02.011.
103. Lukashev, A.N. Recombination among picornaviruses / A.N. Lukashev // *Rev. Med. Virol.* – 2010. – Vol. 20. – № 5. – P. 327-337. – DOI: 10.1002/rmv.660.
104. Smura, T. Evolution of newly described enteroviruses / T.Smura,C.Savolainen-Kopra, M. Roivainen // *Future Virol.* –2010. –Vol. 6. –№ 1. –P. 15–18. – DOI: 10.2217/fvl.10.62
105. Gmyl, A.P. Diverse mechanisms of RNA recombination / A.P. Gmyl, V.I. Agol // *Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 39. – № 4. –P. 529-542. – DOI: 10.1007/s11008-005-0069-x.
106. Agol, V.I. Molecular Mechanisms of Poliovirus Variation and Evolution / V.I. Agol // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2006. –№ 2. – P. 211–212. – DOI: 10.1007/3-540-26397-7\_8.
107. Chevaliez, S. Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination / S. Chevaliez, A. Szendrői, V. Caro, J. Balanant [et al.]. // *Virology.* – 2004. – Vol. 325. – № 1. – P. 56–70. – DOI: 10.1016/j.virol.2004.04.026.
108. Oberste, M.S. RNA Recombination Plays a Major Role in Genomic Change during Circulation of Coxsackie B Viruses / M.S. Oberste, S. Peñaranda, M.A. Pallansch. // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – № 6. – P. 2948–2955. – DOI: 10.1128/jvi.78.6.2948-2955.2004.
109. Santti, J. Evidence of Recombination among Enteroviruses / J. Santti, T. Hyypiä, L. Kinnunen, M. Salminen. / *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73. – № 10. – P. 8741–8749. – DOI: 10.1128/JVI.73.10.8741-8749.1999.
110. Lukashev, A.N. A role of recombination in the evolution of enteroviruses / A.N. Lukashev // *Vopr. Virusol.* –2005. – Vol. 50. – № 3. –P. 46–52. – DOI: 10.1002/rmv.457.
111. Agol, V.I. Emergency Services of Viral RNAs: Repair and Remodeling / Agol V.I., Gmyl A.P // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2018. – Vol. 82. – № 2. –P. 1-42. – DOI: 10.1128/MMBR.00067-17.
112. Ward, C.D. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro / C.D. Ward, M.A. Stokes, J.B. Flanagan. // *J. Virol.* –1988. – Vol. 62. – № 2. – P. 558-562. – DOI: 10.1128/JVI.62.2.558-562.1988.
113. Arnold, J.J. Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase (3Dpol): Pre-Steady-State Kinetic

Analysis of Ribonucleotide Incorporation in the Presence of Mg<sup>2+</sup> / J.J. Arnold, C.E. Cameron // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 18. – P. 5126-5137. – DOI: 10.1021/bi035213q.

114. Arias, A. Determinants of RNA-Dependent RNA Polymerase (In)fidelity Revealed by Kinetic Analysis of the Polymerase Encoded by a Foot-and-Mouth Disease virus Mutant with Reduced Sensitivity to Ribavirin / A. Arias, J.J. Arnold, M. Sierra, E.D. Smidansky [et al.]. // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82. – № 24. – P. 12346–12355. – DOI: 10.1128/JVI.01297-08.

115. Domingo, E. Viruses at the edge of adaptation / E. Domingo // *Virology*. – 2000. – Vol. 270. – № 2. – P. 251–253. – DOI: 10.1006/viro.2000.0320.

116. Domingo, E. Coxsackieviruses and Quasispecies Theory: Evolution of Enteroviruses / E. Domingo, V. Martin, C. Perales, C. Escarmis. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2008. – Vol. 323. – P. 3–4. – DOI: 10.1007/978-3-540-75546-3\_1.

117. Escarmis, C. Manrubia E.L.S.C. Population Bottlenecks in Quasispecies Dynamics / C Escarmis, E Lázaro, S C Manrubia. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 141–142. – DOI: 10.1007/3-540-26397-7\_5.

118. Eigen, M. Viral quasispecies. / M. Eigen // *Sci Am.* – 1993. – Vol. 269. – № 1. – P. 9-42. – DOI: 10.1038/scientificamerican0793-42.

119. Lauring, A.S. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses / A.S. Lauring, R. Andino // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6. – № 7. – P. 1–8. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1001005.

120. Pfeiffer, J.K. Increased Fidelity Reduces Poliovirus Fitness and Virulence under Selective Pressure in Mice / J.K. Pfeiffer, K. Kirkegaard // *PLoS Pathog.* – 2005. – Vol. 1. – № 2. – P. 102. – DOI: 10.1371/journal.ppat.0010011.

121. Gnädig, N.F. Coxsackievirus B3 mutator strains are attenuated in vivo / N.F. Gnädig, S. Beaucourt, G. Campagnola, A.V. Bordería [et al.]. // *PNAS.* – 2012. – Vol. 109. – № 34. – P. 294-303. – DOI: 10.1073/pnas.1204022109.

122. Meng, T. Attenuation of Human Enterovirus 71 High-Replication-Fidelity Variants in AG129 Mice / T. Meng, J. Kwang // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88. – № 10. – P. 5803-5815. – DOI: 10.1128/JVI.00289-14.

123. Vignuzzi, M. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population / M. Vignuzzi, J.K. Stone, J.J. Arnold, C.E. Cameron [et al.]. // *Nature.* – 2006. –



Vol. 439. – № 7074. – P. 344–348. – DOI: 10.1038/nature04388.

124. Eigen, M. Error catastrophe and antiviral strategy / M. Eigen // PNAS. –2002. – Vol. 99. – № 21. – P. 13374-13376. – DOI: 10.1073/pnas.212514799.
125. Grande-Pérez, A. Suppression of viral infectivity through lethal defection / A. Grande-Pérez, E. Lázaro, P. Lowenstein, E. Domingo [et al.]. // PNAS. – 2005. – Vol. 102. – № 12. – P. 4448–4452. – DOI: 10.1073/pnas.0408871102.
126. Summers, J. Examining The Theory of Error Catastrophe / J. Summers, S. Litwin // J. Virol. – 2006. – Vol. 80. – № 1. –P. 20-26. – DOI: 10.1128/JVI.80.1.20-26.2006.
127. Huang, S.-W. A Selective Bottleneck Shapes the Evolutionary Mutant Spectra of Enterovirus A71 during Viral Dissemination in Humans / S. Wen Huang, Y.-H. Huang, H.-P. Tsai , Pin-Hwa Kuo [et al.]. //J. Virol. – 2017. – Vol. 91. – № 23. – P. 1–20. – DOI: 10.1128/JVI.01062-17.
128. Clarke, D.K. Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses / D.K. Clarke, E.A. Duarte, A. Moya, S.F. Elena, E. Domingo [et al.]. // J. Virol. – 1993. – Vol. 67. – № 1. – P. 222–228. – DOI: 10.1128/JVI.67.1.222-228.1993.
129. Escarmis, C. Biological Effect of Muller’s Ratchet: Distant Capsid Site Can Affect Picornavirus Protein Processing / C. Escarmís, C. Perales, E. Domingo. // J. Virol. – 2009. – Vol. 83. – № 13. – P. 6748-6756. – DOI: 10.1128/JVI.00538-09.
130. Pérez-losada, M. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences Marcos / M. Pérez-Losada, M. Arenas, J. Carlos Galán, F. Palero [et al.]. // Infect. Genet. Evol. – 2015. – Vol. 30. – P. 296–307. – DOI: 10.1016/j.meegid.2014.12.022.
131. Solińska, J.S. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution / J. S. Solińska, A. Urbanowicz, M. Figlerowicz, J.J. Bujarski. // Annu Rev Phytopathol. – 2011. – Vol. 49. – P. 415-443. – DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095351.
132. Simon-loriere, E. RNA structures , genomic organization and selection of recombinant HIV / E. Simon-loriere, P. Rossolillo, M. Negroni. // RNA Biol. – 2011. – Vol. 8. – P. 280-286. – DOI: 10.4161/rna.8.2.15193.
133. Terletskaia-Ladwig, E. A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: Comparison with conventional cell culture and RT-PCR / E. Terletskaia-Ladwig, S. Meier, R. Hahn, M. Leinmüller [et al.]. // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57. – № 8. – P. 1000–1006.

– DOI: 10.1099/jmm.0.47799-0.

134. Simmonds, P. Recombination and Selection in the Evolution of Picornaviruses and Other Mammalian Positive-Stranded RNA Viruses / P. Simmonds // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – № 22. – P. 11124–11140. – DOI: 10.1128/JVI.01076-06.

135. Tan, C.Y.Q. Screening and detection of human enterovirus 71 infection by a real-time RT-PCR assay in Marseille, France, 2009-2011 / C.Y.Q. Tan, G. Gonfrier, L. Ninove, C. Zandotti [et al.]. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18. – № 4. – P. 7–10. – DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03769.x.

136. Brown, P. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: Threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication / P. Brown, E.H. Rau, B.K. Johnson, A.E. Bacote [et al.]. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – Vol. 97. – № 7. – P. 3418–3421. – DOI: 10.1073/pnas.97.7.3418.

137. Alamgir, A.S.M. Precise Identification of Endogenous Proviruses of NFS / N Mice Participating in Recombination with Moloney Ecotropic Murine Leukemia Virus ( MuLV ) To Generate Polytopic MuLVs. / A.S.M. Alamgir, N. Owens, M. Lavignon, F. Malik. // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79. – № 8. – P. 4664–4671. – DOI: 10.1128/JVI.79.8.4664-4671.2005.

138. Bell, S.M. Modern-day SIV viral diversity generated by extensive recombination and cross-species transmission./ S.M. Bell, T. Bedford // *Plos Pathog.* – 2017. – Vol. 13. – P. 1–21. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1006466.

139. Filomatori, C.V. RNA recombination at Chikungunya virus 3' UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability / C.V. Filomatori, E.S. Bardossy, F. Merwaiss, Y. Suzuki [et al.]. // *Plos Pathog.* – 2019. – Vol. 15. – P. 1–27. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1007706.

140. Etienne, L. Gene loss and adaptation to hominids underlie the ancient origin of HIV-1 / L. Etienne, B.H. Hahn, P.M. Sharp, F.A. Matsen [et al.]. // *Cell Host Microbe.* – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 85–92. – DOI: 10.1016/j.chom.2013.06.002.

141. Chen, Y. Inter- and Intramolecular Recombinations in the Cucumber Mosaic Virus Genome Related to Adaptation to *Alstroemeria*./ Y. Chen, R. Goldbach, M. Prins. // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76. – № 8. – P. 4119–4124. – DOI: 10.1128/jvi.76.8.4119-4124.2002.

142. Erickson, A.K. Bacteria facilitate enteric virus co-infection of mammalian cells and promote genetic recombination / A.K. Erickson, P.R. Jesudhasan, M.J. Mayer, A. Narbad [et al.]. // *Cell Host Microbe.* – 2019. – Vol. 23. – № 1. – P. 77–88. – DOI: 10.1016/j.chom.2017.11.007.

143. Gmyl, A.P. Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus / A.P. Gmyl, E.V. Belousov, S.V. Maslova, E.V. Khitrina [et al.]. // *J Virol.* – 1999. – Vol. 73. – № 11. – P. 8958–8965. – DOI: 10.1128/JVI.73.11.8958-8965.1999.
144. Kirkegaard, K. The Mechanism of RNA Recombination in liovirus / K. Kirkegaard, D. Baltimore // *Cell.* – 1986. – Vol. 43. – № 3. – P. 433–443. – DOI: 10.1016/0092-8674(86)90600-8.
145. Galli, A. Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus / A. Galli, J. Bukh // *Trends Microbiol.* Elsevier Ltd, – 2014. – Vol. 22. – № 6. – P. 354-364. – DOI: 10.1016/j.tim.2014.02.005.
146. Kirkegaard, K. Genetic analysis of picornaviruses / K. Kirkegaard // *Curret Opin. Genet. Dev.* – 1992. – № 2. – P. 64–70. – DOI: 10.1016/s0959-437x(05)80324-7.
147. Nechaev, S.Y. Non-Enzymatic Template-Directed Recombination of RNAs / S.Y. Nechaev, A.V. Lutay, V.V. Vlassov, M.A. Zenkova. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – P. 1788–1807. – DOI: 10.3390/ijms10041788.
148. Holmblat, B. Nonhomologous Recombination between Defective Poliovirus and Coxsackievirus Genomes Suggests a New Model of Genetic Plasticity for Picornaviruses / B. Holmblat, S. Jégouic, C.Muslin, B. Blondel [et al.]. / *MBio.* – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. 1–12. – DOI: 10.1128/mBio.01119-14.
149. Muslin, C. Evolution and Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination : Plasticity and Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. / C. Muslin, M.-L. Joffret, I. Pelletier, B. Blondel [et al.]. // *Plos Pathog.* – 2015. – № 11. – P. 1–30. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1005266.
150. Lowry, K. Recombination in Enteroviruses Is a Biphasic Replicative Process Involving the Generation of Greater-than Genome Length ‘ Imprecise ’ Intermediates / K. Lowry, A. Woodman, J. Cook, D.J. Evans. // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10. – № 6. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1004191.
151. Runckel, C. Identification and Manipulation of the Molecular Determinants Influencing Poliovirus Recombination / C. Runckel, O. Westesson, R. Andino, J.L. DeRisi. // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9. – № 2. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1003164.
152. Simões, T.R., Sphenodontian phylogeny and the impact of model choice in Bayesian morphological clock estimates of divergence times and evolutionary rates / T.R. Simões, M.W. Caldwell, S.E. Pierce. // *BMC Biol. BMC Biology.* – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-30. –

DOI: 10.1186/s12915-020-00901-5.

153. Dinh, V. Online Bayesian phylogenetic inference: Theoretical foundations via sequential Monte Carlo / V. Dinh, A.E. Darling, F.A. Matsen. // *Syst. Biol.* – 2018. – Vol. 67. – № 3. – P. 503–517. – DOI: 10.1093/sysbio/syx087.
154. Meyer, X. Adaptive Tree Proposals for Bayesian Phylogenetic Inference / X. Meyer // *Syst. Biol.* – 2021. – Vol. 70. – № 5. – P. 1015-1032. – DOI: 10.1093/sysbio/syab004.
155. Nascimento, F.F. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis / F.F. Nascimento, M. Dos Reis, Z. Yang. // *Nat. Ecol. Evol.* – 2017. – Vol. 1. – № 10. – P. 1446-1454. – DOI: 10.1038/s41559-017-0280-x.
156. Ho, S.Y.W. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales / S.Y.W. Ho, S. Duchêne // *Mol. Ecol.* – 2014. – Vol. 23. – № 24. – P. 5947-5965. – DOI: 10.1111/mec.12953.
157. Oberste, M.S. Complete genome sequences for nine simian enteroviruses / M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch. // *J. Gen. Virol.* – 2007. – Vol. 88. – № 12. – P. 3360–3372. – DOI: 10.1099/vir.0.83124-0.
158. Worobey, M. A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus / M. Worobey, G.Z. Han, A. Rambaut. // *Nature.* – 2014. – Vol. 508. – № 7495. – P. 254-257. – DOI: 10.1038/nature13016.
159. Thorne, J.L. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data / J.L. Thorne, H. Kishino // *Syst. Biol.* – 2002. – Vol. 51. – № 5. – P. 689-702. – DOI: 10.1080/10635150290102456.
160. Wertheim, J.O. Relaxed molecular clocks, the bias-variance trade-off, and the quality of phylogenetic inference / J.O. Wertheim, M.J. Sanderson, M. Worobey, A. Bjork. // *Syst. Biol.* – 2010. – Vol. 59. – № 1. – P. 1–8. – DOI: 10.1093/sysbio/syp072.
161. Margoliash, E. Primary Structure and Evolution of Cytochrome C. / E. Margoliash // *Proc. Natl. Acad. Sci. United States.* – 1963. – Vol. 50. – № 1961. – P. 672–679. – DOI: 10.1073/pnas.50.4.672.
162. Zuckerkandl, E. Molecules as documents of evolutionary history / E. Zuckerkandl, L. Pauling // *J. Theor. Biol.* – 1965. – Vol. 8. – № 2. – P. 357-366. – DOI: 10.1016/0022-5193(65)90083-4.
163. Oberste, M.S. Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification / M.S. Oberste, K. Maher, D.R. Kilpatrick, M.A. Pallansch. // *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73. – № 3. – P. 1941–1948. –

DOI: 10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

164. Zuckerkandl, E. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins / E. Zuckerkandl, L. Pauling // *Evol. Genes Proteins.* – 1965. – P. 97-166. – DOI: 10.1016/j.it.2017.04.005.
165. Yang, Z. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov Chain Monte Carlo method / Z. Yang, B Rannala. // *Mol. Biol. Evol.* – 1997. – Vol. 14. – № 7. – P. 717-724. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025811.
166. Drummond, A.J. Relaxed phylogenetics and dating with confidence / A.J. Drummond, S.Y.W. Ho, M.J. Phillips, A. Rambaut. // *PLoS Biol.* – 2006. – Vol. 4. – № 5. – P. 699–710. – DOI: 10.1371/journal.pbio.0040088.
167. Thorne, J.L. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution / J.L. Thorne, H. Kishino, I.S. Painter. // *Mol. Biol. Evol.* – 1998. – Vol. 15. – № 12. – P. 1647-1657. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025892.
168. Ho, S.Y.W. Accuracy of rate estimation using relaxed-clock models with a critical focus on the early metazoan radiation / S.Y.W. Ho, M.J. Phillips, A.J. Drummond, A. Cooper. // *Mol. Biol. Evol.* – 2005. – Vol. 22. – № 5. – P. 1355–1363. – DOI: 10.1093/molbev/msi125.
169. Lepage, T. General comparison of relaxed molecular clock models. / T. Lepage, D. Bryant, H. Philippe, N. Lartillot. // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 24. – № 12– P. 2669-2680. – DOI: 10.1093/molbev/msm193.
170. Huelsenbeck, J.P. A compound Poisson process for relaxing the molecular clock / J.P. Huelsenbeck, B. Larget, D. Swofford. // *Genetics.* – 2000. – Vol. 154. – № 4. –P. 1879-1892. – DOI: 10.1093/genetics/154.4.1879.
171. Ho, S.Y.W. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales / S.Y.W. Ho, S. Duchêne // *Mol. Ecol.* – 2014. – Vol. 23. – № 24. –P. 5947–5965. – DOI: 10.1111/mec.12953.
172. Aris-Brosou, S. Bayesian Models of Episodic Evolution Support a Late Precambrian Explosive Diversification of the Metazoa / S. Aris-Brosou, Z. Yang // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – Vol. 20. – № 12. – P. 1947-1954. – DOI: 10.1093/molbev/msg226.
173. Kishino, H. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution / H. Kishino, J.L. Thorne, W.J. Bruno. // *Mol. Biol. Evol.* – 2001. – Vol. 18. – № 3. – P. 352–361. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003811.

174. Yang, Z. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds / Yang Z., Rannala B. // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 23. – № 1. – P. 212-226. – DOI: 10.1093/molbev/msj024.
175. Shapiro, B. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences / B. Shapiro, A. Rambaut, A.J. Drummond. // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 23. – № 1. – P. 7-9. – DOI: 10.1093/molbev/msj021.
176. Goldman, N. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences / N. Goldman, Z. Yang // *Mol. Biol. Evol.* – 1994. – Vol. 11. – № 5. – P. 725-736. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040153.
177. Hastings, W.K. Monte carlo sampling methods using Markov chains and their applications / W.K. Hastings. // *Biometrika.* – 1970. – Vol. 57. – № 1. – P. 97-109. – DOI: 10.2307/2334940.
178. Drummond, A.J. BEAST : Bayesian evolutionary analysis by sampling trees./ A.J. Drummond, A. Rambaut. // *BMC Evol Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1–8. – DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.
179. Gill, M.S. Online bayesian phylodynamic inference in BEAST with application to epidemic reconstruction / M.S. Gill, P. Lemey, M.A. Suchard, A. Rambaut. // *Mol. Biol. Evol.* – 2020. – Vol. 37. – № 6. – P. 1832–1842. – DOI: 10.1093/molbev/msaa047.
180. Zhang, R. Improving the performance of Bayesian phylogenetic inference under relaxed clock models / R. Zhang, A. Drummond // *BMC Evol. Biol.* – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-28. – DOI: 10.1186/s12862-020-01609-4.
181. Drummond, A.J. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data / A.J. Drummond, G.K. Nicholls, A.G. Rodrigo, W. Solomon. // *Genetics.* – 2002. – Vol. 161. – № 3. – P. 1307–1320. – DOI: 10.1093/genetics/161.3.1307.
182. Shapiro, B. A bayesian phylogenetic method to estimate unknown sequence ages / B. Shapiro, S.Y.W. Ho, A.J. Drummond, M.A. Suchard [et al.]// *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – № 2. – P. 879–887. – DOI: 10.1093/molbev/msq262.
183. Gmyl, A.P. Functional and genetic plasticities of the poliovirus genome: quasi-infectious RNAs modified in the 5'-untranslated region yield a variety of pseudorevertants / A.P. Gmyl, E.V. Pilipenko, S.V. Maslova, G.A. Belov [et al.]// *J. Virol.* – 1993. – Vol. 67. – № 10. – P. 6309–6316. – DOI: 10.1128/JVI.67.10.6309-6316.1993.

184. Nikolaidis M. et al. Large-scale genomic analysis reveals recurrent patterns of intertypic recombination in human enteroviruses / M. Nikolaidis, K. Mimouli, Z. Kyriakopoulou, M. Tsimpidis [et al.]. // *Virology*. Elsevier Inc. – 2019. – Vol. 2. – № 526. – P. 72–80. – DOI: 10.1016/j.virol.2018.10.006.
185. Oberste, M.S. Evidence for Frequent Recombination within Species Human Enterovirus B Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes / M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch. // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78 – № 2. – P. 855–867. – DOI: 10.1128/jvi.78.2.855-867.2004.
186. Lukashev, A.N. Recombination in circulating Human enterovirus B: Independent evolution of structural and non-structural genome regions / A.N. Lukashev, V.A. Lashkevich, O.E. Ivanova, G.A. Koroleva [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 86. – № 12. – P. 3281–3290. DOI: 10.1099/vir.0.81264-0.
187. Leitch, E.C.M. Transmission Networks and Population Turnover of Echovirus 30 / E.C. McWilliam Leitch, J. Bendig, M. Cabrerizo, J. Cardoso, T. Hyypia [et al.]. // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83. – № 5. – P. 2109–2118. – DOI: 10.1128/JVI.02109-08.
188. Wang, M. Rules governing genetic exchanges among viral types from different Enterovirus A clusters / Min Wang, Liuyao Zhu, Jun Fan, Jingjing Yan [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2020. – Vol. 101. – № 11. – P. 1170–1181. – DOI: 10.1099/jgv.0.001479.
189. Lukashev, A.N. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses / A.N. Lukashev, Y.A. Vakulenko // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98. – № 12. – P. 2968-2981. – DOI: 10.1099/jgv.0.000966.
190. Gür, S. Serological Survey of Bovine Enterovirus Type 1 in Different Mammalian Species in Turkey / S. Gur, O. Yapkic, A. Yilmaz // *Zoonoses Public Health.* – 2008. – Vol. 55. – № 2. – P. 106–111. – DOI: 10.1111/j.1863-2378.2007.01095.x.
191. Harvala, H. Detection and Genetic Characterization of Enteroviruses Circulating among Wild Populations of Chimpanzees in Cameroon: Relationship with Human and Simian Enteroviruses / H. Harvala, C.P Sharp, E.M. Ngole, E. Delaporte [et al.]. // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85. – № 9. – P. 4480–4486. – DOI: 10.1128/JVI.02285-10.
192. Grutzmacher, K.S. Codetection of Respiratory Syncytial Virus in Habituated Wild Western Lowland Gorillas and Humans During a Respiratory Disease Outbreak / K.S. Grutzmacher, S. Köndgen, V. Keil, A. Todd [et al.]. // *Ecohealth.* – 2016. – Vol. 13. – P. 499–510. – DOI: 10.1007/s10393-016-1144-6.
193. Карпов, Г. М. Изучение биологических свойств вируса и разработка средств и методов

лабораторной диагностики везикулярной болезни свиней: диссертация канд. вет. наук: 16.00.03 / Карпов Геннадий Маркелович; ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. – Покров, 1979. – 140 с.

194. Луговская, Н.Н. Антигенное родство штамма О-72 с европейскими и азиатскими штаммами вируса везикулярной болезни свиней / Н.Н. Луговская. // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2012. – Т. 10. – С. 113-121. – Рез. англ. – Библиогр.: с. 120 - 121.

195. Федорищева, А. Г. Изучение эпизоотологии везикулярной болезни свиней, вызванной вирусом II серотипа: диссертации канд. вет. наук: 16.00.03 / Федорищева Александра Гавриловна; ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. - Покров, 1980. – 137 с.

196. Savolainen-Kopra, C. 5' Noncoding Region Alone Does Not Unequivocally Determine Genetic Type of Human Rhinovirus Strains / C. Savolainen-Kopra, S. Blomqvist, T. Smura, M. Roivainen [et al.]. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – № 4. – P. 1278–1280. – DOI: 10.1128/JCM.02130-08.

197. Zell, R. Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses / R. Zell, A. Krumbholz, M. Dauber, E. Hoey [et al.]. // J. Gen. Virol. – 2006. – Vol. 87. – № 2. – P. 375–385. – DOI: 10.1099/vir.0.81298-0.

198. Yozwiak, N.L. Human Enterovirus 109: a Novel Interspecies Recombinant Enterovirus Isolated from a Case of Acute Pediatric Respiratory Illness in Nicaragua / N.L. Yozwiak, P. Skewes-Cox, A. Gordon, S. Saborio [et al.]. // J. Virol. – 2010. – Vol. 84. – № 18. – P. 9047–9058. – DOI: 10.1128/JVI.00698-10.

199. Smura, T. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution / T. Smura, S. Blomqvist, A. Paananen, T. Vuorinen [et al.]. // J. Gen. Virol. – 2007. – Vol. 88. – № 9. – P. 2520–2526. – DOI: 10.1099/vir.0.82866-0.

200. Dedepsidis, E. Retrospective characterization of a vaccine-derived poliovirus type 1 isolate from sewage in Greece / E. Dedepsidis, Z. Kyriakopoulou, V. Pliaka, C. Kottaridi [et al.]. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – № 21. – P. 6697–6704. – DOI: 10.1128/AEM.00535-07.

201. Boros, A. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep / A. Boros, P. Pankovics, N.J. Knowles, G. Reuter. // J. Gen. Virol. – 2012. – Vol. 93. – № 9. – P. 1941–1951. – DOI: 10.1099/vir.0.041335-0.

202. Oberste, M.S. Naturally Acquired Picornavirus Infections in Primates at the Dhaka. / M.S.



Oberste, M.M. Feeroz, K. Maher, W. Allan Nix. // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87. – № 1. – P. 572–580. – DOI: 10.1128/JVI.00838-12.

203. Zheng, T. Characterisation of two enteroviruses isolated from Australian brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand Brief Report. / T. Zheng. // *Arch Virol.* – 2007. – № 1 – P. 191–198. – DOI: 10.1007/s00705-006-0838-4.

204. Nollens, H.H. Short Communication: New Recognition Of Enterovirus Infections In Bottlenose Dolphins (*Tursiops Truncatus*) / H.H. Nollens, R. Rivera, G. Palacios, J.F.X. Wellehan [et al.]. // *Vet Microbiol.* – 2009. – Vol. 139. – P. 170–175. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.05.010.

205. WHO. Polio laboratory manual / WHO. // *WHO Libr.* – 2004. – Vol. 4. – № 8. – P. 1-157.

206. Lukashev, A.N. Recombination strategies and evolutionary dynamics of the Human enterovirus A global gene pool / A.N Lukashev, E.Y. Shumilina, I.S. Belalov, O.E. Ivanova [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2014. – Vol. 95. – № 4. – P. 868–873. – DOI: 10.1099/vir.0.060004-0.

207. Oberste, M.S. Species-specific RT-PCR amplification of human enterovirus: A tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses / M.S. Oberste, K. Maher, A.J. Williams, N. Dybdahl-Sissoko [et al.]. // *J. Gen. Virol.* – 2006. – Vol. 87. – № 1. – P. 119–128. DOI: 10.1099/vir.0.81179-0.

208. Allan Nix, W. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens / W.Allan Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch. // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – № 8. – P. 2698–2704. – DOI: 10.1128/JCM.00542-06.

209. WHO, CDC. Enterovirus surveillance guidelines Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative / WHO // *Enterovirus Surveill. Guidel.* – 2015. – P. 1–47.

210. Lukashev, A.N. Recombination in uveitis-causing enterovirus strains / A.N. Lukashev, V. A. Lashkevich, G.A. Koroleva, J. Ilonen [et al.]. // *J. Gen. Virol.* 2004. Vol. 85, № 2. P. 463–470. DOI: 10.1099/vir.0.19469-0.

211. Matz, M. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR / M. Matz, D. Shagin, E. Bogdanova, O. Britanova [et al.]. // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – № 6. – P. 1558–1560. – DOI: 10.1093/nar/27.6.1558.

212. Matz, M. V. Amplification of cDNA ends using PCR suppression effect and step-out PCR. /

- M.V. Matz, N.O. Alieva, A. Chenchik, S. Lukyanov. // *Methods Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 221. – P. 41–49. – DOI: 10.1385/1-59259-359-3:41.
213. Dahllund, L. The genome of echovirus 11 / L. Dahllund, L. Nissinen, T. Pulli, V.P. Hyttinen [et al.]. // *Virus Res.* – 1995. – Vol. 35. – P. 215–222. – DOI: 10.1016/0168-1702(94)00104-k.
214. Staden, R. The Staden Sequence Analysis Package / R. Staden // *Mol. Biotechnol.* – 1996. – № 5- 3. – P. 233-241. – DOI: 10.1007/BF02900361.
215. Kumar, S. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz [et al.]. / *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547–1549. – DOI: 10.1093/molbev/msy096.
216. Drummond, A.J. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences / A.J. Drummond, A. Rambaut, B. Shapiro, O.G. Pybus. // *Mol. Biol. Evol.* – 2005. – Vol. 22. – № 5. – P. 1185–1192. – DOI: 10.1093/molbev/msi103.
217. Shapiro, B. Choosing Appropriate Substitution Models for the Phylogenetic Analysis of Protein-Coding Sequences / B. Shapiro, A. Rambaut, A.J. Drummond. // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 23. – № 1. – P. 7-9. – DOI: 10.1093/molbev/msj021.
218. Ivanova, O.E. Non-Polio Enteroviruses Isolated by Acute Flaccid Paralysis Surveillance Laboratories in the Russian Federation in 1998 – 2021 : Distinct Epidemiological Features of Types / O.E. Ivanova, T.P. Ereemeeva, N.S. Morozova, Y.M. Mikhailova [et al.]. // *Viruses.* – 2024. – Vol. 16. – № 135. – P. 1–15. – DOI: 10.3390/v16010135.
219. Ivanova, O.E. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in a child : fast transformation from Sabin-like virus to vaccine-derived poliovirus triggered an epidemiological response in two countries of the European region / O.E. Ivanova, L.I. Kozlovskaya, T.P. Ereemeeva, A.K. Shakaryan [et al.]. // *Int. J. Infect. Dis.* – 2022. – Vol. 125. – P. 35–41. – DOI: 10.1016/j.ijid.2022.09.034.
220. Tee, K.K. Evolutionary Genetics of Human Enterovirus 71: Origin, Population Dynamics, Natural Selection, and Seasonal Periodicity of the VP1 Gene / K.K.Tee, T.T.-. Lam, Y.F. Chan, J.M. Bible [et al.]. // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – № 7. – P. 3339–3350. – DOI: 10.1128/JVI.01019-09.
221. Yoke-Fun, C. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes / C. Yoke-Fun, S. AbuBakar // *BMC Microbiol.* – 2006. – № 6. – P. 1–11. – DOI: 10.1186/1471-2180-6-74.

222. Sanden, S. Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963-2010 / S. van der Sanden, J. van Eek, D.P. Martin, H. van der Avoort. // *Infect. Genet. Evol.* Elsevier B.V.. – 2011. – Vol. 11. – № 5. – P. 886–894. – DOI: 10.1016/j.meegid.2011.02.011.
223. Nishimura, Y. Cellular receptors for human enterovirus species A / Y. Nishimura, H. Shimizu // *Front. Microbiol.* – 2012. – Vol. 105. – № 3. – P. 1-5. – DOI: 10.3389/fmicb.2012.00105.
224. Brown, B. Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region / B. Brown, M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch. // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – № 16. – P. 8973–8984. – DOI: 10.1128/jvi.77.16.8973-8984.2003.
225. Jegouic, S. Recombination between Polioviruses and Co-Circulating Coxsackie A Viruses : Role in the Emergence of Pathogenic Vaccine-Derived Polioviruses./ N. Combela, B. Holmblat, M.-L. Joffret, F. Colbère-Garapin [et al.]. // *Viruses.* – 2009. – Vol. 5. – P.1-13.– DOI: 10.3390/v3081460.
226. Liu, Y. Direct Interaction between Two Viral Proteins , the Nonstructural Protein 2C ATPase and the Capsid Protein VP3 , Is Required for Enterovirus Morphogenesis. / Y. Liu, C. Wang, S. Mueller, A.V Paul [et al.]. // *Plos Pathog.* – 2010. – Vol. 6. – № 8. – P.1-14. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1001066.
227. Khetsuriani, N. Enterovirus Surveillance - United States , 1970—2005 / N. Khetsuriani, A. LaMonte-Fowlkes, M.S. Oberste, M.A. Pallansch. // *MMWR.* – 2006. – Vol 55. – P.1-20.