

На правах рукописи

Шустова Елена Юрьевна

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

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:

Лукашев Александр Николаевич – доктор медицинских наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН.

Официальные оппоненты:

Юминова Надежда Васильевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний отдела вирусологии им. О.Г. Анджпаридзе, профессор отдела аспирантуры Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Подколзин Александр Тихонович – доктор медицинских наук, заместитель директора по эпидемиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте: <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Энтеровирусы (ЭВ) 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. 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. 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. 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 относительно друг 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 ЭВ 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, 2C 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 ЭВ 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Штаммы энтеровирусов вида А

Для определения филогенетических взаимоотношений ЭВ генома, нами были отобраны 80 образцов ЭВ 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. 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.

1.2. Используемые штаммы энтеровирусов вида В

Для исследования филогенетических взаимоотношений ВВБС, прототипные штаммы O72 и T75 были получены из коллекции патогенов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (Таблица 1).

Таблица 1 – Используемые штаммы энтеровирусов вида В

№	Номер штамма	Тип	Страна, место выделения	Год выделения	Диагноз
1	O72	CVB5	Украина, г. Одесса	1972	Везикулярная болезнь свиней
2	T75	CVB4	Россия, г. Тамбов	1975	Везикулярная болезнь свиней

1.3. Клеточные линии

В данной работе была использована перевиваемая культура клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Культивирование проводили с использованием среды Игла MEM (Minimum Essential Medium) (производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллина, стрептомицина) и 5% фетальной бычьей сыворотки (производства Gibco, Австралия). Флаконы инкубировали в термостате при температуре 37°C с содержанием CO₂ 5%.

1.4. Молекулярно-биологические методы исследования

1.4.1. Выделение РНК

Выделение РНК из 100 мкл вирусной суспензии проводили при помощи набора реагентов «РИБО-сорб» (АмплиСенс, Россия) по протоколу к набору.

1.4.2. 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 производителями протоколам с использованием рандомных гексамерных олигонуклеотидов или специфического обратного праймера.

1.4.3. 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 полного участка VP1 в некоторых случаях использовали протокол, опубликованный ранее, с использованием праймеров 486 и 489 [J. Gen. Virol. 2006; 87(1):119]

Для определения полной нуклеотидной последовательности участка генома 2С ЭВ вида А, в некоторых случаях использовали ПЦР с праймерами 4355F и 4813R по программе надзора за энтеровирусными инфекциями, одобренной ВОЗ [J. Clin. Microbiol. 2006; 44(8):2698]

Для определения нуклеотидной последовательности области генома 3D использовали вложенный (nested) и ступенчатый (gradient) ПЦР со специфичными праймерами.

Амплификацию участков генома проводили на амплификаторе Терцик производства ДНК-Технология (Россия) и амплификаторе Arktik модель 5020 производства TermoFisher Scientific (Финляндия).

1.4.4. Электрофорез ПЦР-продуктов и очистка образцов

Аналитический электрофорез проводили в 2% агарозном геле 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. ДНК выделяли из геля при помощи набора «QIAquick gel extraction kit» (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

1.5. Определение нуклеотидной последовательности

Нуклеотидные последовательности участков генома, представленные в работе, были получены с помощью секвенирования методом Сэнгера при помощи набора реагентов BigDye 3 на секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Концы генома ЭВ 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, США), которая позволяет быстро амплифицировать 5'- и 3'-концевые фрагменты. Штамм Т75 был секвенирован в Институте вирусологии, Университетского медицинского центра Бонна, Германия.

1.6. Анализ нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидные последовательности изучаемых штаммов, были выровнены по аминокислотной последовательности в соответствии с рамкой считывания. Выравнивание и обработка нуклеотидных последовательностей производились с помощью программы BioEdit версия 7.0.5.2 и MEGA X.

Построение филогенетических деревьев проводили с помощью программы BEAST версии 1.10.4 и вспомогательных приложений (Beauty v1.10.4). Байесовский алгоритм, реализованный в

BEAST версии 1.10.4, использовался для датирования узлов дерева в трех областях генома. При обработке данных применялась модель молекулярных часов SRD06 с логнормальным распределением скорости замен ослабленных молекулярных часов.

Для оценки эволюционных расстояний между нуклеотидными последовательностями ЭВ 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.

Построение графика сходства нуклеотидных последовательностей и графика бутскан-анализа, для ЭВ вида В, проводили с помощью программы SimPlot v 3.5.1 со скользящим окном в 500 нуклеотидов с шагом в 50 нуклеотидов.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Получение нуклеотидных последовательностей энтеровирусов

Для изучения рекомбинационных событий у ЭВ вида А, было выбрано 3 участка генома: полный фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий 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). Во многих работах целью исследования служили участки генома, кодирующие белки VP1 и 3D, как мишени изучения рекомбинационных событий. Для подробного анализа эволюционных событий ЭВ, 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 ЭВ вида А. Позиции нуклеотидных последовательностей указаны по позициям прототипного штамма EV-A71 BrCr, номер доступа U22521 (Рисунок 1).

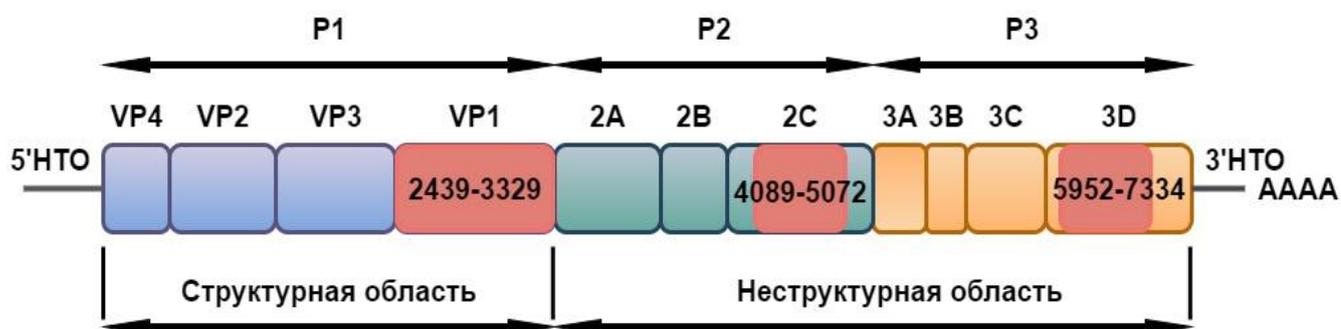


Рисунок 1 – Схема расположения исследуемых областей генома ЭВ вида А. Красным показаны области, взятые для исследования

В результате работы было исследовано 80 образцов НПЭВ вида А. Было установлено, что отобранные нами образцы относятся к 13 типам ЭВ вида А. Всего было определено 240 нуклеотидных последовательностей трех участков генома ЭВ вида А. Полученные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа KC879327-KC879556.

Для оценки эволюционных событий и установления времени происхождения двух штаммов-прототипов O72 и T75, данные вирусы были размножены в культуре клеток RD. Для штамма T75 ЭВ 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. Номера доступа GenBank полученных последовательностей ЭВ вида В: KT006373 и KT006374.

2.2. Филогенетические взаимоотношения в участках генома VP1, 2С, 3D энтеровирусов человека вида А

Анализ филогенетических отношений трех областей генома: VP1, 2С и 3D исследуемых ЭВ вида А показал многочисленные рекомбинационные события в неструктурной области генома для большинства штаммов.

В структурной области генома VP1 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. 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. Все прототипные штаммы исследуемых вирусов заняли корневое положение в каждой группе, кроме штамма CV-A7 (номер в GenBank AY421765), а также прототипного штамма «нового» ЭВ EV-A90 (номер в GenBank AY697460). В областях генома 2С и 3D филогенетическое группирование значительно отличается от VP1, что указывает на множественные рекомбинационные события (Рисунок 2).

В областях генома 2С и 3D большинство штаммов EV-A71 сохранили три группы, соответствующие субгенотипам В1 – В5, С1 – С3 и С4. Было несколько последовательностей EV-A71 в неструктурной области 2С (четыре из 48 последовательностей: две последовательности субгенотипа В4 и две последовательности субгенотипа С2) и в 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 EV71 также не было значительных доказательств рекомбинации (изменения топологии дерева, поддерживаемой апостериорной вероятностью >75 %) между тремя областями генома. Точно так же все 14 изолятов CV-A16, секвенированных в ходе данного исследования, образовали одну филогенетическую группу без признаков рекомбинации между VP1, 2С и 3D областями генома (Рисунок 2, группа IV), за исключением прототипного штамма CV-A16 (U05876 из Южной Африки, выделенного в 1951 году). EV71 и CV-A16 практически во всех случаях группируются вместе в трех областях генома и реже вовлечены в рекомбинационные события (Рисунок 2 EV-A71 - группы I – III, CV-A16 – группа IV). Время жизни общего предка отобранных нами образцов EV-A71 составляет 103 года (95% ДИ 88-119). Время жизни общего предка (tMRCA) EV-A71 генотипа В по участку генома VP1 составляет 48 лет (95% доверительный интервал (ДИ) 42-53 лет), субгенотипов С1 – С3 – 32 года (95% ДИ 27-36 лет), субгенотипа С4 – 21 год (95% ДИ 18-25 лет) (Рисунок 2, группы I – III). Исследуемые CV-A16 имеют tMRCA по участку генома VP1 около 22 лет назад (95% ДИ 18-26 лет) (Рисунок 2, группа IV). Общий предшественник участка генома VP1 современных штаммов группы Коксаки в пределах каждого типа датируется от 12 (CV-A5) до 89 лет назад (CV-A2). Данное значение для современных и прототипных штаммов достигает до 194 лет (CV-A16) (Рисунок 2).

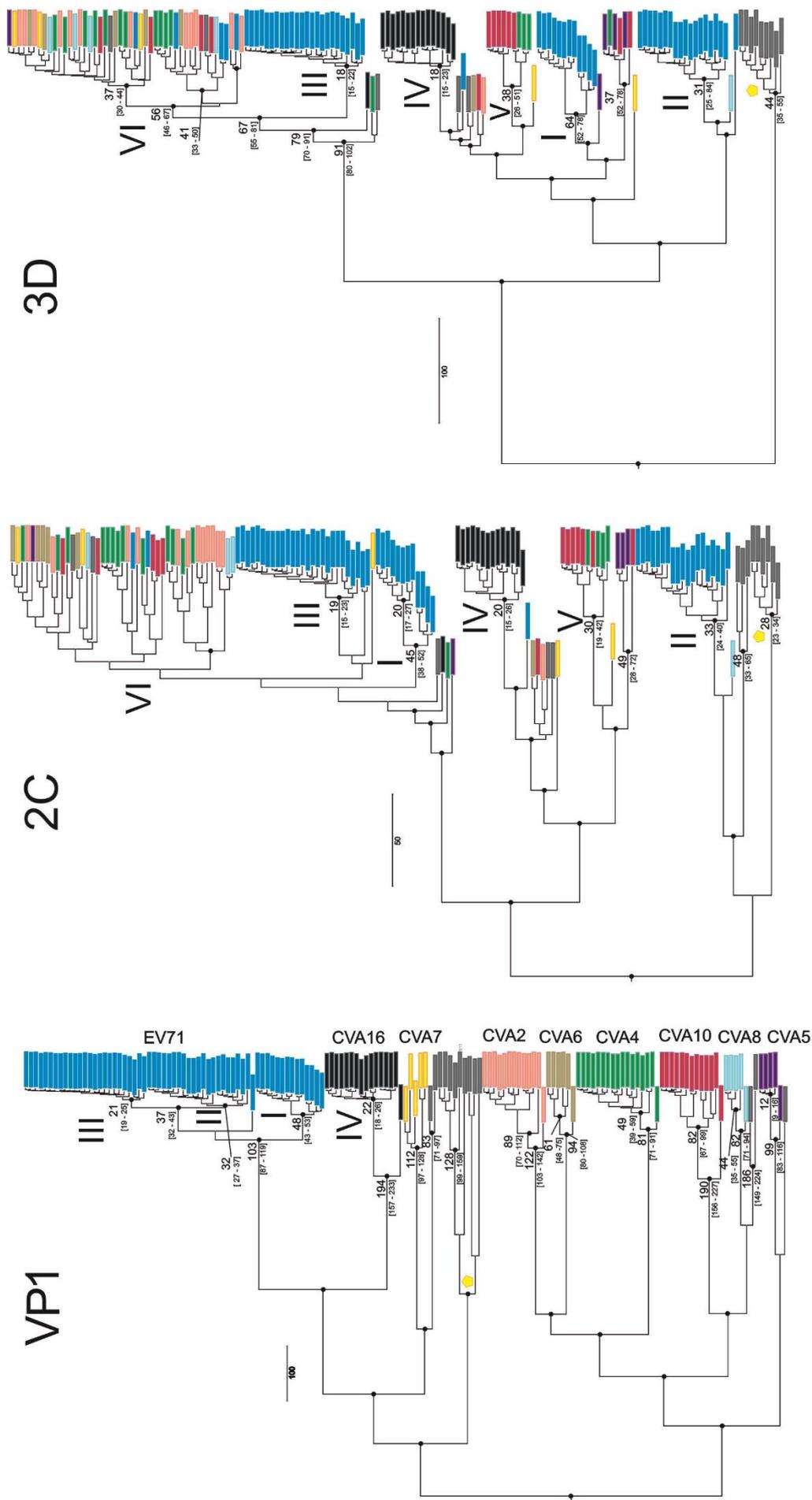


Рисунок 2 – Филогенетические деревья участков генома VP1, 2С, 3D энтеровирусов вида А, построенные в программе BEAST 1.10.4. Штаммы окрашены в соответствии с их типом. Узлы дерева с апостериорной вероятностью больше 0,75 отмечены точками. Цифрами указано время жизни общего предка с 95% доверительным интервалом. Римские цифры обозначают группы, о которых идет речь в тексте. Желтым пятиугольником отмечены «новые энтеровирусы». Шкала показывает длину ветви в годах

Все вирусы группы 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, которая включает 29 вирусов 9 типов (Рисунок 2). Вирусы, вошедшие в эту группу, составляют большую часть исследуемых типов и активно участвуют в рекомбинации. К сожалению, корневой узел этой группы в области генома 2С не имеет достоверной статистической поддержки, что не позволяет делать детальный ее анализ. Также, в участке генома 3D, как и в участке генома 2С, образовалась смешанная группа (Рисунок 2, 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 изолята 41423 CV-A4, вошедшего в другой кластер в участке генома 3D. tMRCA по участку генома VP1 составил: 49 лет для CV-A4 (95% ДИ 33-58 и 82 года для CV-A10 (95% ДИ 71-91). tMRCA группы V по участкам генома 2С и 3D составляет 30 лет (95% ДИ 18-41 лет) и 38 лет (95% ДИ 26-50 лет) соответственно. Консервативные группы, содержащие ЭВ типа CV-A2, были сохранены только в двух областях генома (VP1 и 2С), причем в области генома 2С, только половина исследуемых изолятов вошла в один кластер, остальные были хаотично разбросаны по филогенетическому дереву. tMRCA CV-A2 по участку генома VP1 составляет 89 лет (95% ДИ 71-112 лет), по участку генома 2С 24 года (95% ДИ 15-34 года).

Новые ЭВ, такие как EV-A90 и EV-A91 EV-A89, EV-A76, образовали отдельные группы в трех областях генома. В области VP1 tMRCA данных типов составляет около 378 лет (95% ДИ 265-494). В области генома 2С они составили две отдельные группы: первая - EV-A90 и EV-A91 (tMRCA 49 лет назад (95% ДИ 33-65), вторая - EV-A89 и EV-A76 (tMRCA предка 28 лет назад (95% ДИ 22-34)). На филогенетическом дереве по участку генома 3D типы EV-A76, EV-A90, вместе с прототипным штаммом EV-A76, образуют отдельную группу. Эта группа имеет tMRCA около 44 лет назад (95% ДИ 34-54).

Таким образом, ЭВ вида А, представленные типами EV-A71, CV-A16, CV-A4 и CV-A10, по результатам полученных данных, характеризуются ограниченной рекомбинацией, так как сохранили свои группы на филогенетических деревьях для неструктурных областей генома. Другие ЭВ группы Коксаки в неструктурных областях генома не сохранили ни одной группы, выявленной в области генома VP1, что свидетельствует об их активном участии в рекомбинационных событиях. «Новые» ЭВ, представленные в нашем исследовании тремя изолятами EV-A76 и одним EV-A90, не имели признаков рекомбинации с классическими типами ЭВ вида А и сохранили свои группы в трех областях генома. 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 ЭВ вида А. Все остальные типы ЭВ вида А активно участвовали в рекомбинации.

2.3. Анализ филогенетических отношений трех областей генома энтеровирусов 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 группы Коксаки, кроме типа CV-A16, были перетасованы в областях генома 2С и 3D.

При анализе филогенетических взаимоотношений ЭВ вида А по трем участкам генома, всего было выявлено 29 консервативных групп, сохранившихся между областями генома VP1 -

2С, VP1 - 3D, 2С - 3D. Количество консервативных групп было самым высоким между областями генома VP1 и 2С (28 групп) и примерно одинаковым между VP1 и 3D и областями 2С и 3D (18 и 17 групп соответственно), тогда как расстояние между этими исследуемыми областями генома примерно равны (750 нт между VP1 и 2С и 870 нт между 2С и 3D) (Таблица 2).

Таблица 2 – 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 наблюдаемой рекомбинационной «горячей точке» на границе структурных и неструктурных генов ЭВ и других пикорнавирусов. 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 для 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 ЭВ, измеряемую количеством замен на позиции в год. Зная скорость накопления замен, можно оценить скорость эволюции и время дивергенции типов ЭВ. 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 ЭВ. Показатели скорости накопления замен (выраженные как 10^{-3} нуклеотидных замен на сайт в год) для 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). Для других исследуемых

типов ЭВ группы Коксаки выборка вирусов была небольшая, что не может дать достоверные результаты, и они не рассматривались (Таблица 3).

Показатель скорости накопления замен для EV71 составил 3,9. и похож на ранее опубликованные данные: 4,2–4,6 и 3,7, но отличается от показателя 7,2, описанного в другой работе. 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 (Таблица 3).

Таблица 3 – Анализ сохранившихся групп энтеровирусов вида А в трех областях генома с указанием скорости накопления замен

Типы	Кол-во членов в группах VP1/2С/3D	Филогенетические конфликты внутри группы	tMRCA в VP1, годы	Скорость накопления замен по VP1 (*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-С2 и 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	15/14/15	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]

Ранее была установлена устойчивая взаимосвязь между дивергенцией последовательностей ЭВ в области генома VP1, измеренной по парным расстояниям методом MCL (maximum composite likelihood), и вероятностью рекомбинации в области генома 3D. 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 ЭВ 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 3, Рисунок 4).

Пороговое расстояние, при котором 50% сверяемых последовательностей были рекомбинантными, составило 0,14 для EV-A71 субгенотипов С4; 0,18 для субгенотипов С1-С3; 0,22 для EV-A71 субгенотипов В1, В2, В4, В5 (Рисунок 3).

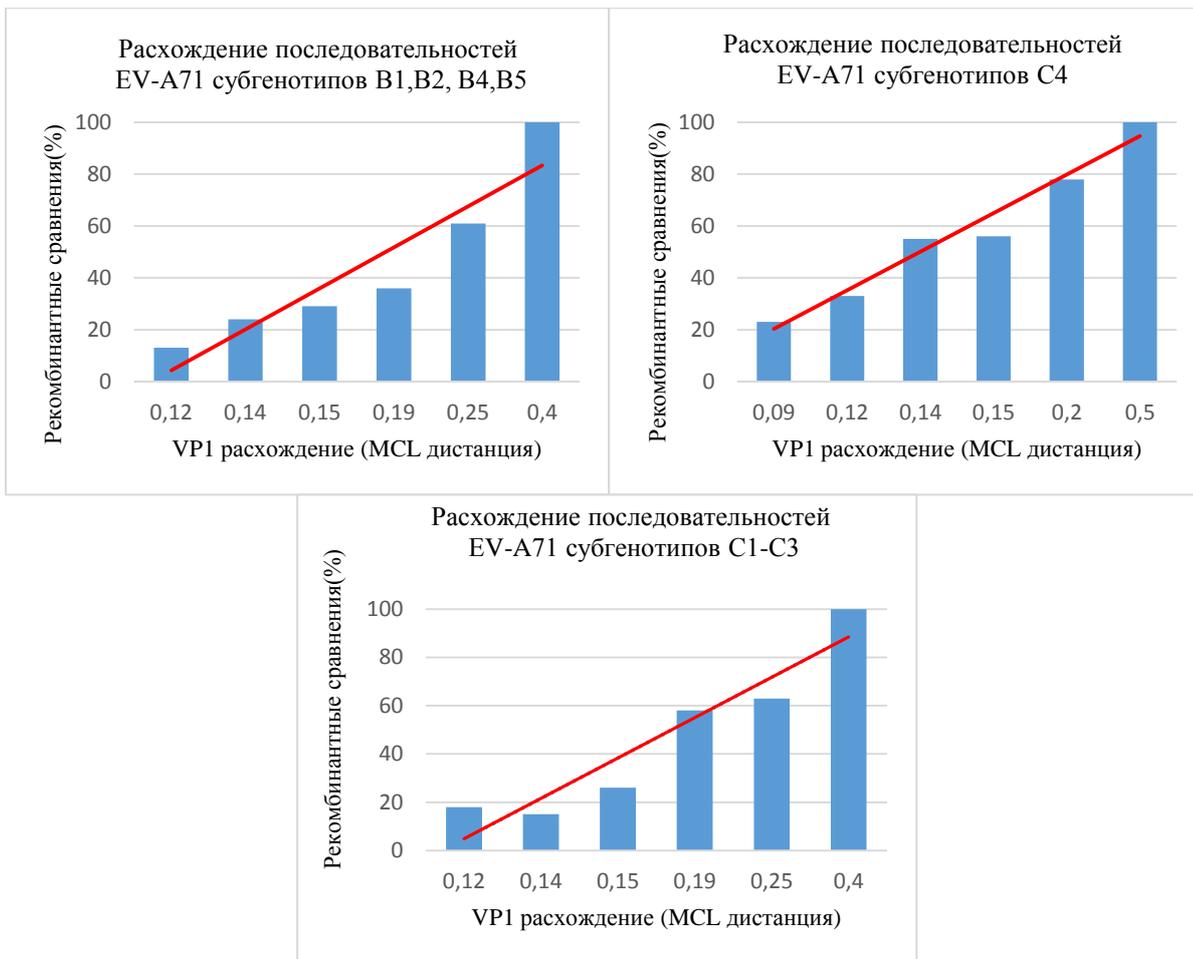


Рисунок 3 – Связь между расхождением последовательностей VP1 (рассчитанное как MCL дистанция) и долей рекомбинантных сравнений (т.е. пар вирусов, принадлежащих к разным группам в области 3D) ЭВ типов EV-A71 субгенотипов C1-C3, C4, B1, B2, B4, B5

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 4).

Используя скорость накопления замен ЭВ, установленную по участку генома VP1, было рассчитано время полужизни рекомбинантных форм этих типов. Время полужизни циркулирующего EV-A71 без признаков рекомбинации составило 23 года для геногруппы C1-C3, 18 лет и 28 лет для геногрупп C4 и B соответственно, 11 лет - для CV-A16. ЭВ типов CV-A4 и CV-A2 показали крайне низкое время полужизни рекомбинантных форм: 3,6 и 2 года соответственно. Для CV-A10 время полужизни составило около 5 лет (Таблица 4).

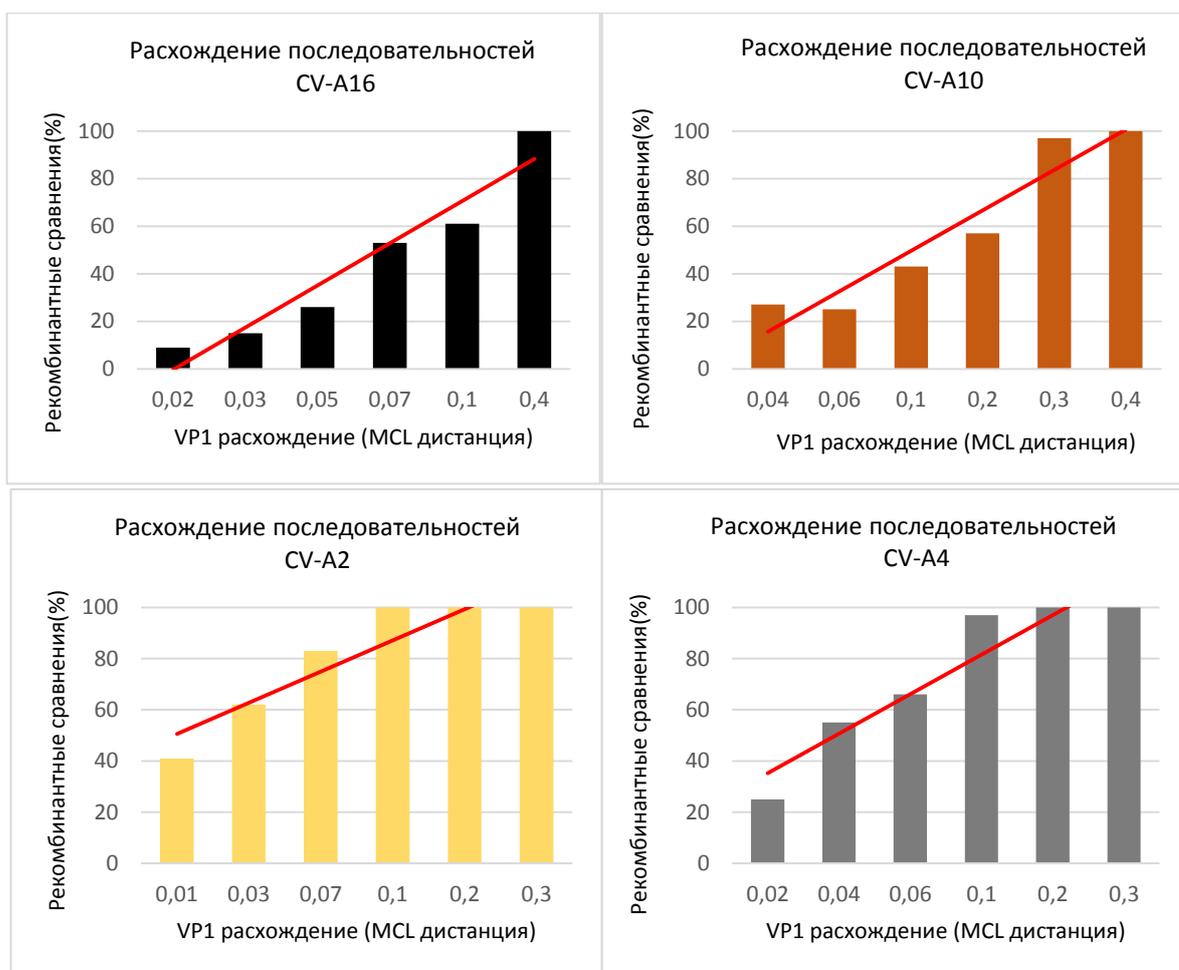


Рисунок 4 – Связь между расхождением последовательностей VP1 (рассчитанное как MCL дистанции) и долей рекомбинантных сравнений (т.е. принадлежащих к разным группам в области 3D) ЭВ типов CV-A16, CV-A2, CV-A10, CV-A4

Таблица 4 – Скорость накопления замен и определение времени полужизни рекомбинантных форм энтеровирусов вида А

	Тип	Скорость накопления замен (*10 ⁻³)	95% ДИ скорости накопления замен (*10 ⁻³)	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 ЭВ 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).

До нашего исследования 80% полных геномных последовательностей ЭВ 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 ЭВ вида А для анализа. Наше исследование показывает, что в событиях рекомбинации, приводящих к появлению подтипов EV-A71, участвуют члены глобального генофонда ЭВ вида А, а не только EV-A71. Это очевидно, потому что три группы ЭВ (Рисунок 2, группы I-III) были равномерно распределены по филогенетическим деревьям областей генома 2С и 3D и не происходили от общего предка. Удивительно, но подтипы EV-A71 почти перестали рекомбинировать с остальной частью генофонда ЭВ вида А после их появления. 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. Кроме того, высокий период полужизни нерекомбинантных штаммов EV-A71 указывает на то, что они являются наиболее консервативными типами с точки зрения частоты рекомбинации среди ЭВ.

2.4. Филогенетическое взаимоотношение штаммов O72 и T75 энтеровирусов вида В

Во многих работах феномен рекомбинации у ЭВ обсуждается в связке с их способностью становиться причиной возникающих заболеваний человека и животных. Одним из классических примеров таких новых заболеваний является везикулярная болезнь свиней, которая возникла в 1960-е гг. из человеческого вируса CV-B5. Чтобы выяснить происхождение вирусов, вызывающих ВБС в бывшем Советском Союзе, были проанализированы два штамма-прототипа O72 и T75, выделенные во время вспышек в Одессе в 1972 и Тамбове в 1975 годах. Была определена нуклеотидная последовательность полного генома штамма T75 и участка генома, кодирующего капсидный белок VP1 штамма O72.

Для филогенетического анализа штамма ВБС O72, вызвавшего эпизоотию в Одессе в 1972 году, были отобраны из Genbank последовательности CV-B5, а также последовательности ВБС (на дереве указаны как SVDV). Штамм O72 был на 87,3-97,0% идентичен другим изолятам ВБС, что подтверждает его принадлежность к этому типу. Анализ проводился по полной нуклеотидной последовательности области генома, кодирующей белок VP1 (2448-3257 нт, позиции нуклеотидных последовательностей указаны по позициям штамма ВБС, номер доступа EU151450). Штамм ВБС, выделенный в Одессе в 1972 году, группировался со штаммами ВБС, выделенными в других странах (Рисунок 5).

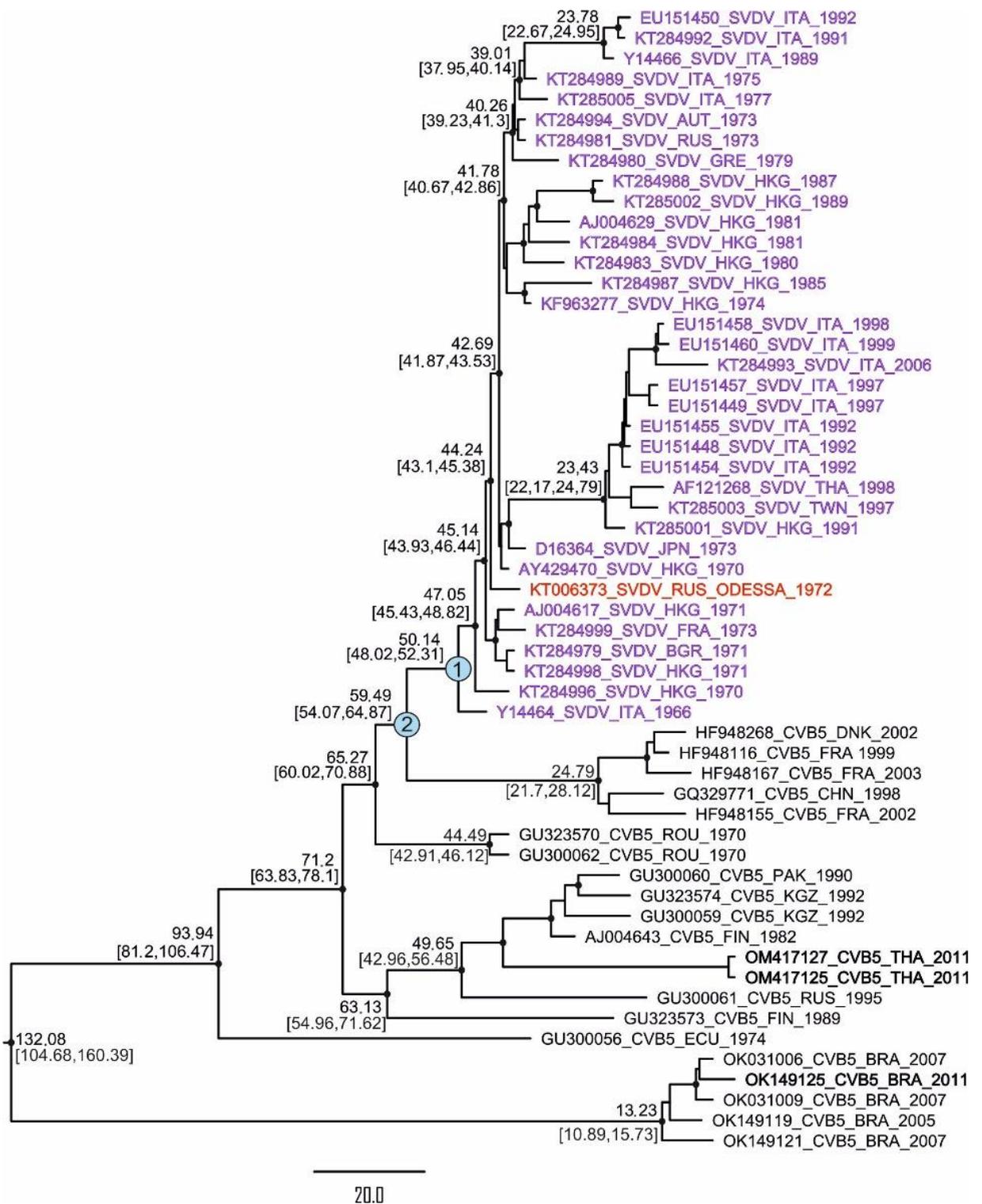


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево по участку генома VP1 энтеровирусов CV-B5 и штамма ВВБС О72 (отмечен красным), построенное в программе BEAST 1.10.4. Узел 1 – вирусы, выделенные от свиней с везикулярной болезнью, отмечены фиолетовым. Узел 2 - ВВБС и ближайшие к ним вирусы CV-B5. Узлы дерева с апостериорной 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)). Шкала показывает длину ветви в годах

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 5, узел 1). Наиболее близкими к ВВБС являются штаммы ЭВ CV-B5, выделенные во Франции в 1998-2003 годах (Рисунок 5, узел 2).

Филогенетический анализ методом молекулярного датирования позволяет вычислить год выделения общего предка исследуемых вирусов. tMRCA рассчитано от года выделения последнего вируса в выборке (выделен черным)) (Рисунок 5). tMRCA всех штаммов ВВБС составляет 50 лет, что соответствует 1961 году (95% ДИ 48-52 лет (1959–1963 гг.)), как и было установлено ранее (Рисунок 5, узел 1). tMRCA ВВБС и наиболее филогенетически близкого CV-B5 – 59 лет, что соответствует 1952 г. (95% ДИ 54-64 лет (1946–1957 гг.)) (Рисунок 5, 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.

Таким образом, ВВБС, скорее всего, возник между 1946 и 1963 годами (95% ДИ по нижнему значению tMRCA ВВБС и по верхнему значению tMRCA ВВБС и CV-B5).

По результатам анализа последовательностей областей генома VP1 определено, что штамм T75 на 80,0–90,4% идентичен последовательностям вируса CV-B4 доступным в GenBank, и поэтому принадлежит к типу CV-B4. Ранее было показано, что классическим ВВБС является тип CV-B5 (Рисунок 6).

Советский штамм T75 группировался со штаммами ЭВ 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 6, узел 3). Ни один из вирусов этой группы не был ассоциирован с заболеваниями свиней.

tMRCA штамма T75 и штаммов CV-B4 в области генома VP1 составило 65 лет назад (рассчитан от года выделения последнего вируса в выборке (выделен черным)), что соответствует 1950 г., 95% ДИ 61-69 лет (1945-1953 гг.) (Рисунок 6, узел 3). Также эта группа вошла в обширный кластер с ЭВ CV-B4. Данная группа имеет общего предка с вирусами, выделенными во Франции (номер в GenBank AF160003, AF160002), Финляндии (номер в GenBank AF160007) и Нидерландах (номер в GenBank AF159998) 73 года назад, что соответствует 1941 году (95% ДИ 68-77 лет (1937- 1946 гг.)) (Рисунок 6, узел 4).

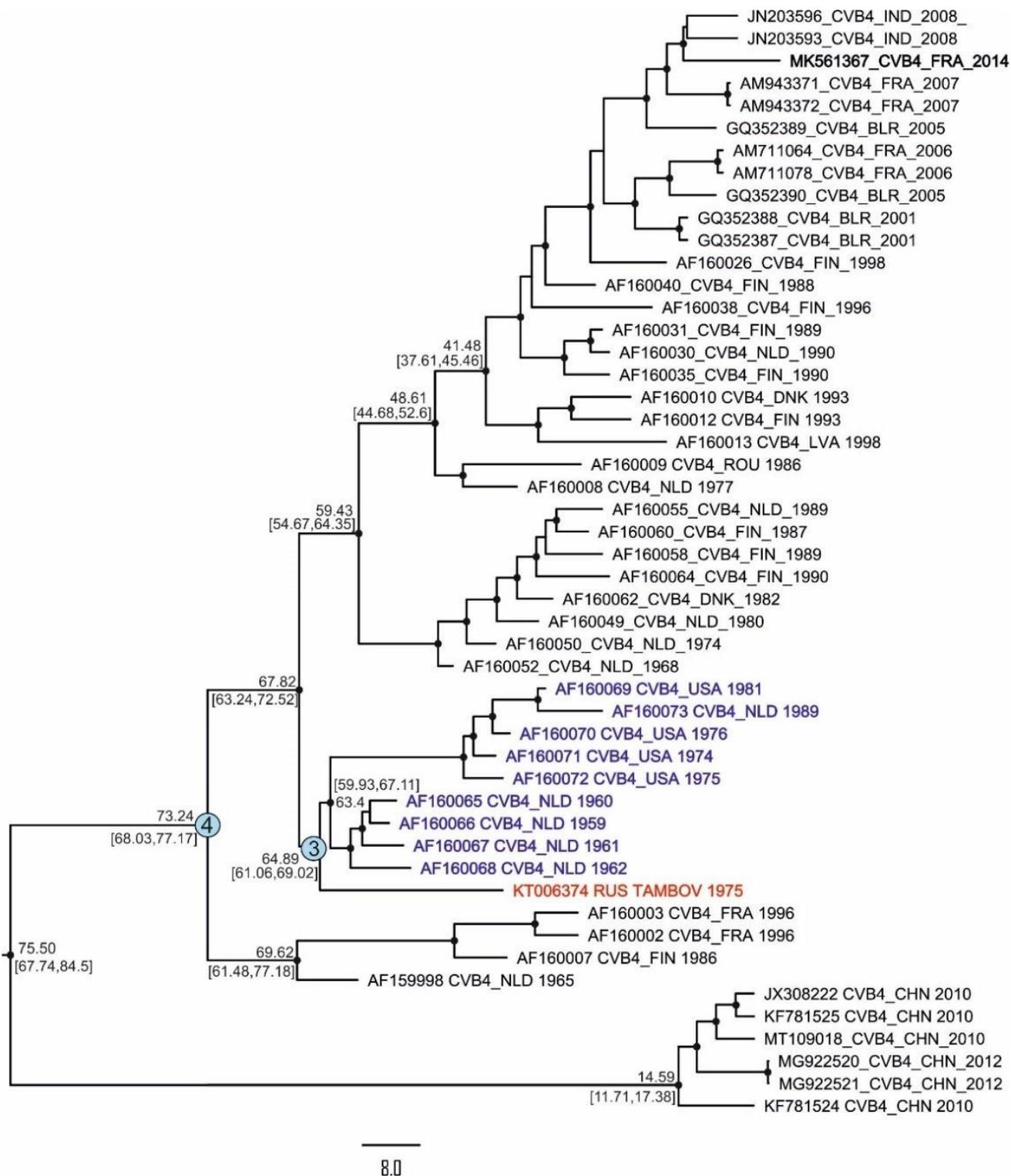


Рисунок 6 – Филогенетические взаимоотношения по участку генома VP1 энтеровирусов CV-B4 и штамма ВВБС Т75 (отмечен красным), построенные в программе BEAST 1.10.4. Узел 3 - вирусы, вошедшие в один кластер с исследуемый штаммом (выделены фиолетовым). Узел 4 - обширная группа, описанная в тексте. Узлы дерева 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)). Шкала показывает длину ветви в годах

Таким образом, можно утверждать, что вирус Т75 произошел от человеческого вируса CV-B4 в промежутке между 1945 годом, и до его выделения в 1975 году. 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. Гипотетически, сельскохозяйственные практики, такие как использование необработанных пищевых отходов и костной муки для кормления свиней, могли способствовать межвидовой передаче двух ЭВ человека свиньям примерно в одно и то же время.

Был проведен анализ генетического сходства полногеномных последовательностей ЭВ вида В типов: CV-B4, CV-B5, E30, E11, ВВБС, Штамма Т75 и наиболее близкого к нему по генетической схожести в неструктурной области генома E7. Бутскан-анализ представителей ЭВ вида В и ВВБС по сравнению с Т75 показывает смену филогенетических взаимоотношений. Исследуемый штамм Т75 является мозаичным рекомбинантом ЭВ вида В и ВВБС. В неструктурной области генома исследуемых ЭВ видны точки перекреста, которые соответствуют точкам рекомбинации (Рисунок 7).

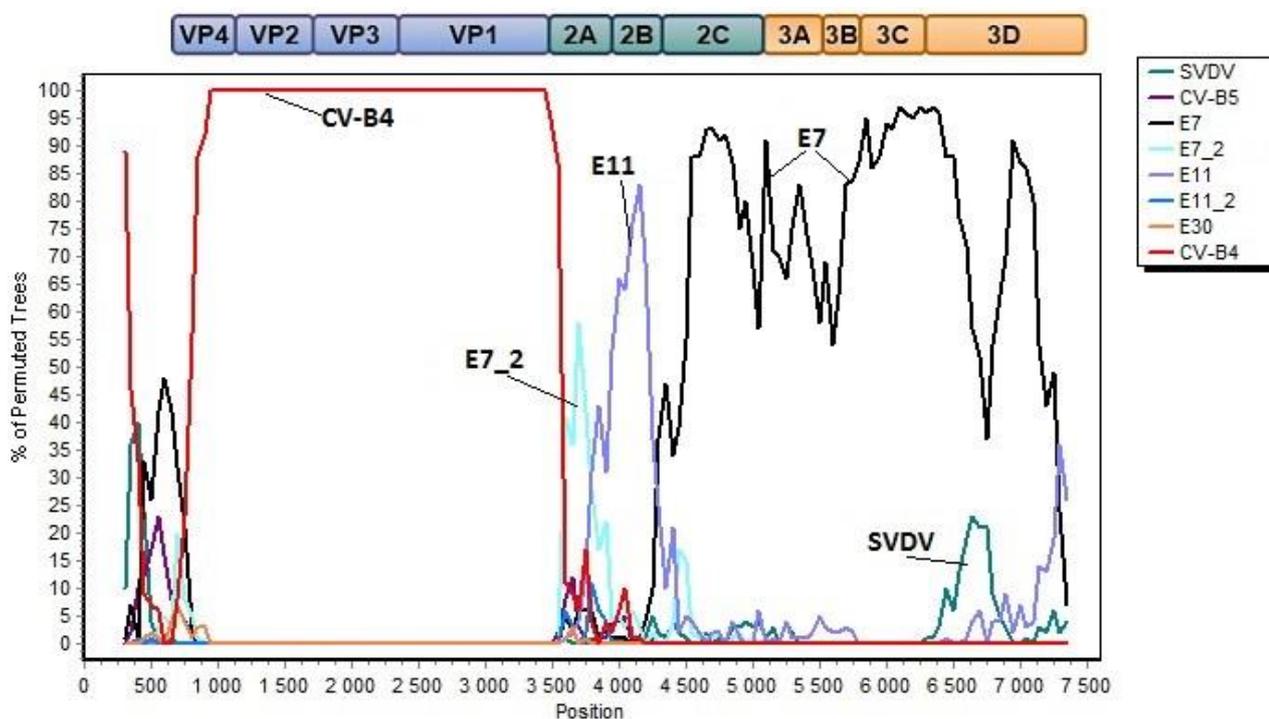


Рисунок 7 – График бутскан-анализа энтеровирусов вида В и ВВБС по сравнению с исследуемым штаммом Т75. График E7 соответствует одному штамму, наиболее сходному при филогенетическом анализе со штаммом Т75 (МН043137), график E7_2 – другим представителям типа E7, группа E11 – состоит из двух штаммов: AJ577590 и EF634316, E11_2 – другим представителям типа E11. Скользящее окно 500 нуклеотидов с шагом в 50 нуклеотидов

В структурной области генома VP2-VP1 наибольший процент вероятности образования групп штамм Т75 имеет с ЭВ типа CV-B4, что характерно для всех штаммов CV-B4. В неструктурной области генома 2С - 3D исследуемый штамм группируется с ЭВ E7 (штамм RIGVIR номер GenBank МН043137).

Интересно отметить, что классический ВВБС после своего возникновения не имел признаков рекомбинации с ЭВ человека ни в одном из участков генома. Это указывает на то, что переход CV-B5 свиньям был единичным, односторонним и окончательным событием.

Уникальность этого события делает еще более значимым описание второго такого события на примере штамма T75, произошедшего от CV-B4.

Возможно, что тупиковая передача ЭВ человека другим видам встречается чаще, чем это известно в настоящее время, и два типа вируса CV-B4 и CV-B5, которые переключились на свиней, могут быть моделью для изучения факторов, ограничивающих эффективный межвидовой перенос ЭВ.

Необходимо дальнейшее изучение ЭВ животных, чтобы определить, могли ли быть другие, пока что неизвестные случаи смены хозяина ЭВ человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомбинация генома между ЭВ одного вида является одной из движущих сил эволюции и причиной появления новых вариантов вирусов. Хотя межвидовая рекомбинация встречается относительно редко, внутривидовая рекомбинация среди ЭВ встречается часто.

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

Была проанализирована естественная рекомбинация в 80 штаммах ЭВ вида А, представленных 13 типами, путем филогенетического анализа трех участков генома: полного участка генома VP1 и частичных участков 2С и 3D. 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 ЭВ 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. ЭВ типов EV-A71 и CV-A16 почти не участвуют в рекомбинации с другими типами. Представители «новых» ЭВ типов EV-A90, EV-A91, EV-A89 и EV-A76 не имели признаков недавней (менее 150 лет) рекомбинации с циркулирующими ЭВ других типов. В результате филогенетического анализа трех областей генома, мы определили три группы ЭВ вида А, имеющие разную частоту рекомбинации в неструктурных областях генома. «Новые» ЭВ, 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 Р2 и Р3 у этих групп. Остальные представители вирусов группы Коксаки подверглись обширной перетасовке в неструктурной области генома.

Анализ консервативных групп исследуемых ЭВ 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). Это наблюдение противоречит опубликованным ранее сообщениям о горячей точке рекомбинации на границе структурных и неструктурных генов VP1-2A ЭВ 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 более 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 2C и 3D, не содержали ни одной последовательности другого типа.

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

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

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. Байесовский филогенетический анализ с методом молекулярного датирования этих образцов с образцами из GenBank, позволил установить, что вирус T75 произошел от человеческого вируса типа CV-B4. Ранее предполагалось, что все вирусы ВБС произошли от CV-B5. Все ВБС 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 T75 и вирусов CV-B4, вошедших в одну группу по области генома, кодирующего структурный белок VP1, появился около 1950 г. (95% ДИ 1945–1953 гг.). Филогенетический анализ областей генома, кодирующих белки 2C и 3D прототипного штамма T75 и других представителей ЭВ вида В показал, что в области генома 2C исследуемый штамм группируется с E7 (штамм RIGVIR номер GenBank MN043137) и значительно отличается от ВБС. В области генома белка 3D T75 вместе с E11 и E7 заняли базальное положение в кластере ВБС, tMRCA их соответствует 1939 году. Интересно отметить, что во всех трех областях генома, предполагаемые даты появления ВБС сопоставимы – 1961 год для областей генома белков VP1 и 2C; 1959 год для области 3D.

При анализе полных геномов ЭВ вида В и T75 было установлено, что штамм T75 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 ЭВ 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 ЭВ. Для изучения эволюционных процессов ЭВ и появления вирусов с новыми свойствами недостаточно только структурной области генома VP1. Так как ЭВ представляют собой пул генетической информации, необходимо изучение всех областей геномов для более точной оценки роли рекомбинации в эволюции вирусов. Для полной картины требуется рутинное секвенирование полных геномов ЭВ человека и животных, а также эпидемиологический надзор в регионах, которым в настоящее время не уделяется должное внимание. Партнёрство между лабораториями разных регионов 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 ЭВ. Необходимо не допускать нарушения норм кормления и норм содержания сельскохозяйственных животных.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Важной задачей дальнейшего изучения механизма возникновения ЭВ является необходимость расширенных исследований для обнаружения рекомбинантных форм. Будет

продолжена работа по идентификации и филогенетическому анализу ЭВ разных видов в разных областях генома.

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Энтеновирус типа 71: Ящуроподобное заболевание, энцефаломиелит, острый отек легких / Лашкевич В.А., Королева Г.А., Лукашев А.Н., Кармышева В.Я., Мустафина А.Н., Худякова Л.В., **Шумилина Е.Ю.** // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 6. – С. 38-47. DOI: 10.17816/EID40646 (БАК, К-2).

2. Recombination strategies and evolutionary dynamics of the Human enterovirus A global gene pool/ Lukashov A.N., **Shumilina E.Y.**, Belalov I.S., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Reznik V. I., Trotsenko O. E., Drexler J. F., Drosten C. //Journal of General Virology. – 2014. – V. 96. – P. 868-873. DOI: 10.1099/vir.0.060004-0 (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q2).

3. Epizootic of vesicular disease in pigs caused by coxsackievirus B4 in the Soviet Union in 1975 / Lomakina N.F., **Shustova E.Y.**, Strizhakova O.M., Drexler J.F., Lukashov A. N. // Journal of General Virology. – 2016. – V. 97. – P. 49-52. DOI: 10.1099/jgv.0.000318 (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q2).

4. 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 / Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., Eremeeva T.P., Shakaryan A.K., Ivanov A.P., Baykova O.Y., Krasota A.Y., **Shustova E.Y.**, Mustafina A.N., Morozova N.S., Bobokhonova M.S., Deshevoi S.E., Ishmukhametov A.A. // Int. J. Infect. Dis. – 2022. – V. 125. – P. 35–41. DOI: 10.1016/j.ijid.2022.09.034 (Scopus, Pub Med, Q3).

5. Non-Polio Enteroviruses Isolated by Acute Flaccid Paralysis Surveillance Laboratories in the Russian Federation in 1998 – 2021: Distinct Epidemiological Features of Types / Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Morozova N.S., Mikhailova Y.M., Kozlovskaya L.I., Baikova O.Y., Shakaryan A.K., Krasota A.Y., Korotkova E.A., Yakovchuk E.V., **Shustova E.Y.**, Lukashov A.N. // Viruses. – 2024. – V. 16. – N 135. – P. 1-15. DOI: 10.3390/v16010135 (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q1).