

На правах рукописи

Зверев Владимир Владимирович

**Идентификация и биохимическая характеристика
геновариантов парэховирусов человека**

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2012

Работа выполнена в ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора и ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Новикова Надежда Алексеевна

Официальные оппоненты:

Корягин Александр Сергеевич доктор биологических наук, профессор, зам. декана по научной работе биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Мазепа Владимир Николаевич доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов надзора за инфекционными заболеваниями ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной

Ведущая организация:

ФГУ «Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии» Минздравсоцразвития России

Защита состоится «__» _____ 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском госуниверситете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальной проблемой современной биохимии является развитие методов генодиагностики, в том числе для заболеваний, вызываемых некультивируемыми или трудно культивируемыми микроорганизмами и вирусами. Такими трудно культивируемыми вирусами, для которых в нашей стране отсутствуют диагностические тест-системы, являются парэховирусы человека.

Парэховирусы человека (сем. *Picornaviridae*, род *Parechovirus*, ПЭВ), первоначально классифицированные как вирусы ECHO22 и ECHO23 в пределах рода *Enterovirus*, были открыты R. Wigand и A. Sabin в 1956 году. Подобно энтеровирусам, парэховирусы являются причиной возникновения множества различных инфекционных заболеваний человека, таких как серозный менингит, миокардит, экзантема, миозит, сепсисоподобное заболевание новорожденных, лихорадка, острый гастроэнтерит и респираторные заболевания [Stanway G. et al., 2000]. Основной группой риска по заболеванию парэховирусной инфекцией являются дети в возрасте до 5 лет [Joki-Korpela P. et al., 2001, Benschop K.S. et al., 2008]. Широкая распространенность и значимость ПЭВ в инфекционной патологии детей первых лет жизни определяют необходимость совершенствования методов их идентификации, в частности методов на основе амплификации нуклеиновых кислот. Специфичность и чувствительность метода ПЦР неразрывно связана со знанием генетического разнообразия возбудителя и с оптимизацией условий проведения ферментативной реакции.

Парэховирусы характеризуются значительным генетическим разнообразием – к настоящему времени идентифицировано, как минимум, 16 типов ПЭВ [www.picornaviridae.com]. Наличие такого количества типов затрудняет разработку ПЦР для выявления и типирования РНК ПЭВ и делает необходимым изучение вариабельности нуклеотидных

последовательностей генома штаммов, циркулирующих на разных территориях.

Важным направлением биохимических исследований является изучение организации биологических структур. Парэховирусы являются недостаточно изученным объектом. Они отличаются от энтеровирусов не только организацией генома, но и структурно-функциональными особенностями капсидных белков [Stanway G., 1999, 2000; Williams C.H. et al., 2009]. Получение новых знаний о первичной и вторичной структуре белков различных геновариантов парэховирусов будет способствовать решению проблемы их узнавания на молекулярном уровне.

В России исследований по изучению разнообразия парэховирусов до начала наших исследований не проводилось в связи с отсутствием диагностических систем и лабораторных методик для обнаружения ПЭВ, что и определило направление исследований данной работы.

Целью исследования явилась разработка методов на основе ПЦР для обнаружения и типовой идентификации парэховирусов человека и биохимическая характеристика их геновариантов.

Задачи исследования:

1. На основе анализа нуклеотидных последовательностей генома ПЭВ, представленных в GenBank, провести теоретическую оценку известных праймеров для детекции РНК ПЭВ разных типов методом ОТ-ПЦР. Выбрать эффективную пару универсальных праймеров для амплификации консервативного участка 5'НТР генома ПЭВ, оптимизировать условия постановки реакции, апробировать метод на клиническом материале.

2. С использованием оптимизированного метода ОТ-ПЦР провести поиск ПЭВ у детей с острым гастроэнтеритом, оценить частоту их обнаружения.

3. Разработать метод идентификации ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов на основе «гнездовой» ПЦР области VP1 генома. Определить типы парэховирусов.

4. Установить первичную структуру нуклеотидных последовательностей фрагментов 5'НТР и области VP3-VP1 генома нижегородских изолятов парэховирусов, изучить их вариабельность.

5. На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома провести филогенетический анализ штаммов, определить генотипы ПЭВ 1-го типа.

6. Проанализировать предсказанные аминокислотные последовательности фрагментов С-концевого участка белка VP3 и N-концевого участка белка VP1 ПЭВ 1-го типа различных генотипов.

Научная новизна работы:

С использованием оптимизированного метода ОТ-ПЦР впервые, на примере г. Нижнего Новгорода, показана циркуляция парэховирусов среди населения России; установлена частота обнаружения ПЭВ у детей с острой кишечной инфекцией равная 3,5-10,4% в разные годы.

Разработан авторский метод идентификации ПЭВ трех наиболее распространенных (1-го, 3-го и 6-го) типов, применение которого впервые показало доминирование в нижегородской популяции парэховирусов ПЭВ 1-го типа.

Впервые определены нуклеотидные последовательности фрагментов генома 5'НТР и области VP3-VP1 российских изолятов парэховирусов человека, которые депонированы в GenBank/EMBL/DDBJ под номерами JF330795-JF330833, JQ437842-JQ437881, JQ437883, JQ437884, что расширило международную базу нуклеотидных последовательностей генов парэховирусов человека из разных регионов мира.

Впервые с использованием анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента области VP3-VP1 генома и, соответственно предсказанных, аминокислотных последовательностей, выявлен и охарактеризован новый 1С генотип ПЭВ 1-го типа, характеризующийся уникальной аминокислотной последовательностью N-конца капсидного белка VP1.

Практическая значимость работы:

Методические разработки по оптимизации и апробации на современных штаммах метода ОТ-ПЦР для универсальной детекции РНК парэховирусов человека, могут стать основой создания отечественной ПЦР-тест-системы для диагностики парэховирусной инфекции.

С участием автора составлен проект методических рекомендаций «Молекулярно-генетические исследования при мониторинге энтеровирусной инфекции: III. Обнаружение и генотипирование парэховирусов человека» (вход. ФС Роспотребнадзора №01/26461-1 от 25.10.2011).

Научные результаты, полученные в ходе выполнения работы, используются в учебном процессе ННГУ им. Н.И. Лобачевского при подготовке магистров и аспирантов, обучающихся по специальности 020201 – биология.

Положения, выносимые на защиту:

Разработана и апробирована панель олигонуклеотидных праймеров, позволяющая в оптимизированных условиях постановки ПЦР проводить универсальную и дифференциальную идентификацию РНК парэховирусов человека.

Разнообразие парэховирусов, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода, представлено как минимум четырьмя типами парэховирусов (1-й, 3-й, 4-й, 6-й), с преобладанием парэховирусов 1-го типа.

Идентифицирован новый 1С генотип ПЭВ 1-го типа, имеющий уникальную аминокислотную последовательность N-конца белка VP1 (NAEESKQSI) в позиции 18-26, которая может служить его биохимическим маркером.

Апробация работы:

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

X Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (г. Санкт-Петербург, 2007 г.);

- VI Нижегородской сессии молодых ученых (г. Нижний Новгород, 2008 г.);
- научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (г. Нижний Новгород, 2011 г.);
- заседаниях Ученого Совета Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной и проблемных научно-практических семинарах института.

Объем и структура диссертации:

Материалы диссертации изложены на 115 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 113 источников литературы отечественных (2) и зарубежных авторов (111). Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и 15 таблицами. По результатам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явилась РНК парэховирусов человека, обнаруженных у детей, госпитализированных в инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода в период 2006-2011 гг.

В работе использовали:

- Нуклеотидные последовательности генома парэховирусов человека и других кишечных вирусов, представленные в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]. Всего использовано 62 последовательности.

- Компьютерные программы: MEGA v.4.0 (2007), 5.0 (2011) [www.mega-software.net]; Oligo 4.0. (1989-91) (США); онлайн-сервис BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]; пакет Lasergene [<http://www.dnastar.com>]

РНК парэховирусов и других кишечных вирусов выделяли методом солевой очистки (патент №2313792) и с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» производства ФГУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению.

Обнаружение РНК парэховирусов проводили методом ОТ-ПЦР на основе универсальных праймеров, предложенных М. Oberste и соавт. [Oberste M. et al. 1999] в оптимизированных условиях ПЦР. Тип парэховирусов определяли с использованием разработанного в данном исследовании «гнездового» варианта ПЦР. Фрагмент области генома VP3-VP1 амплифицировали как предложено Н. Harvala с соавторами [Harvala H., 2008]. Продукты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Определение первичной структуры кДНК осуществляли в автоматическом режиме на приборах ABI Prism 3130 и 3110, согласно рекомендациям производителя.

Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей проводили по алгоритму Neighbor-joining двухпараметрической модели эволюции Kumar в программе MEGA [Kumar S., 2004]. В каждом случае было проанализировано по 100 псевдореplikатов. На филограммах указывали индексы поддержки более 60. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности штаммов всех типов ПЭВ, представленных в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ. Работа по построению филогенетических деревьев проводилась совместно с к.б.н. Л.Н. Голицыной.

Аминокислотные последовательности устанавливали путем перевода на основе стандартного генетического кода нуклеотидных последовательностей фрагментов области VP3-VP1 генома парэховирусов в программе MEGA (v.5.0).

Статистическую обработку осуществляли общепринятым методом с использованием коэффициента Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

1 Оптимизация универсального метода ОТ-ПЦР для выявления РНК парэховирусов человека и его апробация

На первом этапе работы была проведена теоретическая оценка праймеров, представленных в методиках иностранных авторов. При анализе пяти пар олигонуклеотидов, комплементарных участкам 5'НТР генома, который является наиболее консервативным регионом генома парэховирусов человека, по формальным признакам была выбрана пара праймеров K28 и R30, предложенных М. Oberste с соавторами в 1999 г. для идентификации парэховирусов в пробах, пассированных в культурах ткани. Поскольку праймеры были сконструированы на основе последовательностей генома только двух типов ПЭВ больше 10 лет назад, возникла необходимость проведения оценки их специфичности в отношении современных штаммов ПЭВ. С этой целью была сформирована сессия из 38 полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов ПЭВ, депонированных в базе данных GenBank, которая включала геномы современных ПЭВ 8-ми типов (1-8 типы) и геном вируса Ljungan. При выравнивании анализируемых последовательностей и последовательностей праймеров было установлено, что геномы ПЭВ имеют в области посадки праймера K28 единичные нуклеотидные замены, которые не носят систематического характера и не затрагивают 3'-конца олигонуклеотида. Сравнение нуклеотидных последовательностей в области отжига обратного праймера R30 выявило абсолютный консерватизм всех 38-ми анализированных нуклеотидных последовательностей генома 8-ми типов ПЭВ. В связи с вышеизложенным, праймеры, предложенные М. Oberste, оставлены нами без изменений. Установленная консервативность праймеров K28 и R30 в отношении современных штаммов ПЭВ и их универсальность по отношению к геномам 8-ми типов ПЭВ определила их выбор для

использования в нашей дальнейшей работе. Данная пара фланкирует участок 5'НТР генома размером 256 н.о. (по геному ПЭВ 1-го типа, шт. Harris).

Для данной пары праймеров была проведена оптимизация условий постановки ПЦР: теоретически рассчитанную температуру отжига корректировали эмпирически в буферной системе, содержащей 1,5 мМ Mg, вместо обычной ДНК-полимеразы использовали TaqF-ДНК-полимеразу.

В связи с отсутствием в России референтных штаммов ПЭВ и контрольных образцов, содержащих парэховирусы, для апробации оптимизированной методики была взята случайная выборка проб фекалий детей с острым гастроэнтеритом (ОГЭ), отрицательных при ПЦР-тестировании на другие кишечные вирусы (рота-, энтеро-, адено-, норо- и астровирусы). Выбор группы детей основывался на данных научной литературы, в которых указывалось, что наибольшее количество случаев ПЭВ-инфекции было зарегистрировано именно у детей с острым гастроэнтеритом [CDC, 2010]. При исследовании 140 проб были обнаружены образцы, в которых амплифицировался искомый фрагмент кДНК размером 256 п.н. (рис. 1).

Для подтверждения специфичности амплификации было проведено секвенирование 11-ти амплифицированных фрагментов кДНК. Все 11 фрагментов идентифицированы в онлайн-ресурсе BLAST как 5'НТР генома ПЭВ, что свидетельствует о специфичности методики.

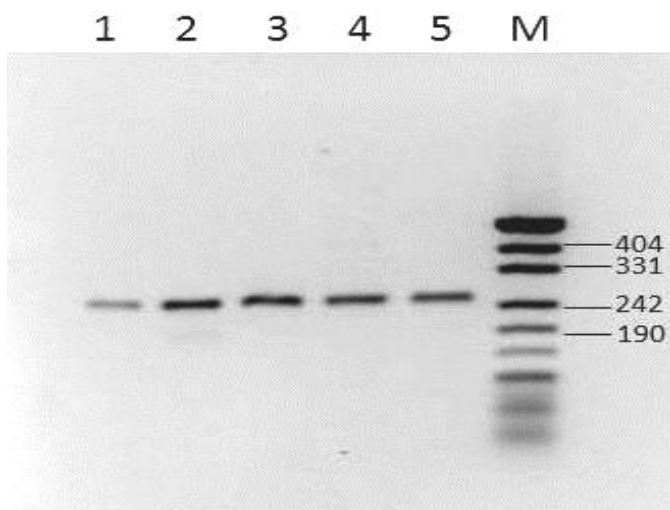


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов 5'НТР генома парэховирусов человека

М – Маркер длин фрагментов ДНК рUC19 /MspI, выраженный в парах нуклеотидов (п.н.).

1-5 – пробы, содержащие РНК ПЭВ.

Для проверки специфичности праймеров в отношении генома ПЭВ осуществлены контрольные постановки ПЦР на геномах других кишечных вирусов: ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов и вируса гепатита А. Результаты ПЦР во всех случаях были отрицательны.

К началу наших исследований циркуляция ПЭВ среди населения была показана для многих стран мира, но не для территории нашей страны. В связи с этим нами, с использованием оптимизированной методики ОТ-ПЦР, впервые в нашей стране (на примере г. Нижнего Новгорода) были проведены исследования по обнаружению РНК ПЭВ у детей, госпитализированных с ОГЭ в 2006 - 2011 гг.,. В ходе работы была исследована 5881 проба копроматериала, РНК парэховирусов человека выявлена у 347 детей с ОКИ, что составило 5,9% (3,5-10,4% в разные годы, $p \leq 0,05$). В 65,1% проб, содержащих парэховирусы, одновременно были обнаружены другие кишечные вирусы. Наиболее часто парэховирусы выявлялись совместно с ротавирусами, реже с энтеро- и норовирусами, в единичных случаях - с адено-, кобу-, астро-, бокавирусами, вирусом гепатита А.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что в результате проведенного исследования апробирована в отношении современных российских штаммов универсальная пара праймеров для идентификации 5'НТР генома ПЭВ и оптимизированы условия проведения ПЦР для обнаружения РНК ПЭВ, в образцах копроматериала, без предварительного выделения вируса на культуре клеток. Специфичность метода подтверждена секвенированием амплифицированных фрагментов кДНК. Применение разработанного метода впервые на примере г. Нижнего Новгорода показало циркуляцию ПЭВ на территории нашей страны на современном этапе и позволило определить частоту обнаружения парэховирусов у детей с ОГЭ, равную, в среднем, 5,9%.

2 Разработка и применение метода идентификации ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов на основе «гнездовой» ПЦР области VP1 генома

К началу нашего исследования было известно, что наиболее часто на разных территориях земного шара встречаются ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов [Khetsuriani N., 2006], что определило постановку задачи по разработке метода дифференциального обнаружения этих типов ПЭВ. Для парэховирусов не установлена локализация серотиповых детерминант, в связи с чем, для разработки метода, по аналогии с другими пикорнавирусами, мы использовали область генома, кодирующую капсидный белок VP1.

Область VP1 генома ПЭВ характеризуется значительной вариабельностью и вырожденностью генетического кода у разных типов, что обосновало разработку двухраундового «гнездового» варианта ПЦР. Суть такого варианта заключается в последовательной амплификации сначала большого фрагмента ДНК с помощью пары «внешних» праймеров (1-й раунд), а затем, на его основе, – синтезе фрагмента меньшего размера с использованием пары «внутренних» праймеров (2-й раунд).

Для постановки первого раунда ПЦР нами была выбрана пара универсальных праймеров VP1-parEchoF1 и VP1-parEchoR1 (фланкируют участок генома размером 759 н.о.), предложенных К. Venschop с соавторами (2006 г.) для универсальной идентификации ПЭВ 1-3-го типов.

На основе сессии из 38-ми полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома ПЭВ 1-8 типов была проведена теоретическая оценка их специфичности. Установлена консервативность мест посадки праймеров по сравнению с другими участками генома. В тоже время, при анализе области отжига праймеров помимо единичных замен, присутствующих у некоторых штаммов ПЭВ разных типов, было выявлено несколько значительных линий вырожденности, прослеживающихся у многих штаммов, которые предопределили необходимость модификации исходных олигонуклеотидов.

По сравнению с исходными праймерами, в модифицированные праймеры внесены следующие изменения: в прямой праймер введены 3 вырожденных основания – 5'-сса **R**aa **Y**tc **R**tg ggg **Y**tc-3', в обратный праймер дополнительно введено вырожденное основание – 5'-aaa cc**Y** ct**R** tct aa**R** ta**W** gc-3'.

Для проведения второго раунда ПЦР нами были созданы собственные праймеры, специфичные в отношении генома ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов. Для подбора праймеров мы оперировали участком генома VP1 размером 759 н. о., который фланкирован праймерами первого раунда ПЦР.

Для каждого типа была создана отдельная сессия выровненных методом Clustal W (Mega 4.0.) нуклеотидных последовательностей, включившая геномы штаммов ПЭВ, различающихся по временным и географическим характеристикам. Пример анализа показан в таблице 1. По результатам сравнительного анализа созданы 3 пары праймеров: праймеры, специфичные в отношении ПЭВ 1-го типа - HPEV1F (5'- ttt **Y**aa **R**tc **Y**at gaa **Y**gt **R**- 3', 19 н.о.) и HPEV1R (5'- ctg t**W**g t**Y**g ttc cag tg-3', 17 н.о.); для ПЭВ 3-го типа – HPEV3F (5'-ttt taa **Y**aa tgg aga **Y**ac c-3', 19 н.о.) и HPEV3R (5'-aac ttc tgc agt agt tcg-3', 18 н.о.); для ПЭВ 6-го типа – HPEV6F (5'-aca atg gcc ctt aaa ttt gac-3', 21 н.о.) и HPEV6R (5'-cga ctt t**S**c ga**R** cgt gg-3', 17 н.о.). Специфичность сконструированных праймеров в отношении геномов ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов была подтверждена путем их сравнительного анализа с соответствующими последовательностями области VP1 генома ПЭВ других типов.

Предлагаемый нами алгоритм проведения генотипирования ПЭВ предполагает амплификацию фрагмента кДНК размером 759 н.о., на матрице которого затем проводится идентификация типовой принадлежности ПЭВ. Размеры получаемых типовых фрагментов незначительно отличаются друг от друга, что не позволяет проводить ПЦР в формате триплекс. В тоже время фрагменты кДНК генома ПЭВ 1-го и ПЭВ 3-го типов различаются на 80 н.о., что предполагает возможность проведения ПЦР для этих типов ПЭВ в одной пробирке.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов области VP1 генома ПЭВ типа 1 в регионе прямого (А) и обратного (Б) праймеров

А)

Источник	Нуклеотидные последовательности 5'→3' (2488-2506)*
HPEV 1 Harris	t t t t a g g t c g a t g a a t g t g
HPEV 1 NO-7878	- - - t - - g - - c - - - - - t - - a
HPEV 1 LK-345	- - - c - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV PicoBank	- - - c - - g - - c - - - - - c - - g
HPEV 1 SH1	- - - t - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 K129-93	- - - t - g a - - t - - - - - t - - a
HPEV 1 2007-863	- - - c - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 677033	- - - c - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 BNI788St	- - - t - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 JP-8275	- - - t - - g - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 K54-94	- - - t - - a - - c - - - - - t - - g
HPEV 1 LK-160	- - - t - - a - - c - - - - - c - - g
HPEV 1F	t t t Y a a R t c Y a t g a a Y g t R

Б)

Источник	Нуклеотидные последовательности 5'→3' (2909-2893)*
HPEV 1 Harris	c a c t g g a a c c t c t a c a g
HPEV 1 NO-7878	- - - - - - - - - g - - a - - - -
HPEV 1 LK-345	- - - - - - - - - a - - a - - g -
HPEV PicoBank	- - - - - - - - - g - - a - - - -
HPEV 1 SH1	- - - - - - - - - a - - a - - - -
HPEV 1 K129-93	- - - - - - - - - a - - a - - - -
HPEV 1 2007-863	g - - - - - g - - c - - t - - t -
HPEV 1 677033	- - - - - - - - - g - - a - g - -
HPEV 1 BNI788St	- - - - - - - - - g - - a - - - -
HPEV 1 JP-8275	- - - - - - g - - g - - a - - - -
HPEV 1 K54-94	- - - - - - - - - a - - a - - - -
HPEV 1 LK-160	- - - - - - - - - a - - a - - - -
HPEV 1R**	c a c t g g a a c Y a c W a c a g

*- позиции праймеров отмечены по геному HPEV 1 BNI-788St

** - последовательность, обратно комплементарная праймеру HPEV 1R

R - a/g, W - t/a, Y - t/c.

Для всех пар праймеров был проведен расчет температуры плавления с использованием программы Oligo 4.0, которую корректировали эмпирическим путем. Специфичность разработанного метода проверена на пробах, содержащих ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов, идентифицированных методом секвенирования фрагмента 5'НТР генома. Результаты представлены на рисунке 2.

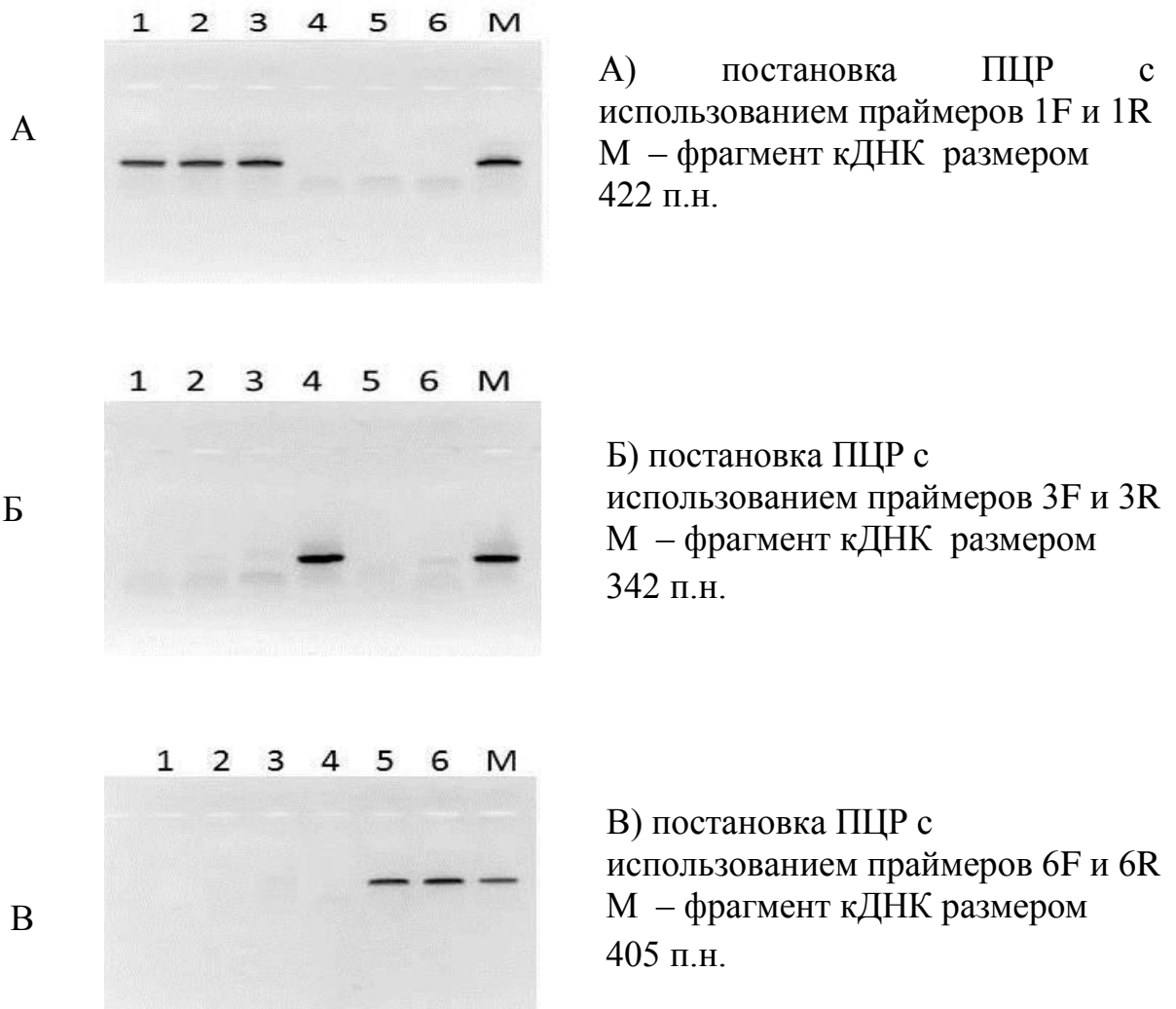


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК области VP1 генома парэховирусов человека

(1-3 – пробы, содержащие РНК ПЭВ 1-го типа; 4 – проба, содержащая РНК ПЭВ 3-го типа; 5, 6 – пробы, содержащие РНК ПЭВ 6-го типа)

Из рисунка видно, что праймеры 1F и 1R амплифицируют только фрагмент кДНК размером 422 п.н., специфичный для ПЭВ 1-го типа (рис. 2А); праймеры 3F и 3R амплифицируют только фрагмент кДНК размером 342 п.н., специфичный для ПЭВ 3-го типа (рис. 2Б); праймеры 6F и 6R амплифицируют только фрагмент кДНК размером 405 п.н., специфичный для ПЭВ 6-го типа (рис. 2В). Разработанный метод был применен нами для идентификации ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов в коллекции ПЭВ-содержащих образцов с целью их дальнейшего изучения. Было исследовано 132 положительных на парэховирусы клинических образца, собранных в период 2006-2010 гг. РНК ПЭВ 1-го типа была идентифицирована в 93 образцах (71 %), 3-го типа в - 8 (6%) и 6-го типа - в 19 (14 %) случаях, в 3% случаев тип ПЭВ определить не удалось. Доминирование ПЭВ 1-го типа и представительство ПЭВ 3-го и 6-го типов, установленное для нижегородской популяции ПЭВ, согласуются с данными о широком распространении этих типов ПЭВ в мире [Benshop K., 2008, Watanabe K., 2007]. При проведении исследований ПЭВ-содержащих образцов методом секвенирования в одной из нетипируемых методом ПЦР проб, был обнаружен ПЭВ 4-го типа, что расширяет наше представление о пейзаже парэховирусов, циркулирующих на территории г. Нижнего Новгорода.

Таким образом, разработан авторский метод идентификации РНК ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов на основе «гнездовой» ПЦР, применение которого позволило впервые показать циркуляцию на территории Нижнего Новгорода ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов, с доминированием ПЭВ 1-го типа. Типовое разнообразие ПЭВ дополнено обнаружением методом секвенирования ПЭВ 4-го типа.

3 Молекулярная характеристика ПЭВ: варибельность нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Изучение биохимического разнообразия геновариантов парэховирусов человека, циркулирующих на территории нашей страны, до настоящей работы не проводилось. Представляло научный интерес исследование варибельности

нуклеотидных последовательностей генома и аминокислотных последовательностей фрагментов капсидных белков ПЭВ разных типов, в особенности 1-го типа, как наиболее распространенного и значимого в инфекционной патологии детей.

3.1 Филогенетический анализ на основе фрагментов κДНК области VP3-VP1 генома ПЭВ 1-го типа

С целью изучения генетического разнообразия ПЭВ, обнаруженных в г. Нижнем Новгороде, было проведено секвенирование фрагментов κДНК области VP3-VP1 генома нуклеотидных последовательностей 71 изолята парэховирусов человека разных типов. В анализе использовали также последовательности 11-ти фрагментов 5'НТР генома. Для 6 изолятов были определены последовательности двух участков генома. ПЭВ 1-го типа был идентифицирован в 65 пробах, генотип был установлен для 56 изолятов.

На основе нуклеотидных последовательностей фрагмента области VP3-VP1 генома было построено филогенетическое дерево (рис. 3). На рисунке видно, что идентифицированные в Нижнем Новгороде ПЭВ 1-го типа распределились по 3-м кластерам, два из которых соответствуют генотипам 1А и 1В. Большинство нижегородских вариантов ПЭВ 1 принадлежит генотипу 1В, который в последние годы распространился на многих территориях мира [Benshop К., 2010]. Нижегородская популяция ПЭВ генотипа 1В филогенетически неоднородна. Среди этих вирусов выделяется три группы, условно названные нами 1В/NN₁, 1В/NN₂ и 1В/NN₃. Для вирусов, представленных в этих группах, уровень гомологии нуклеотидных последовательностей с зарубежными или нижегородскими вариантами других групп ПЭВ-1В, не превышал 95 %. Для всех остальных ПЭВ 1В, идентифицированных в Нижнем Новгороде, уровень гомологии нуклеотидных последовательностей был достаточно высок и составил 98-100 %. Уровень различий нуклеотидных последовательностей анализируемого фрагмента генома ПЭВ, входящих в эти группы достигает 5%, что позволяет говорить о существовании субгенотипов внутри генотипа 1В.

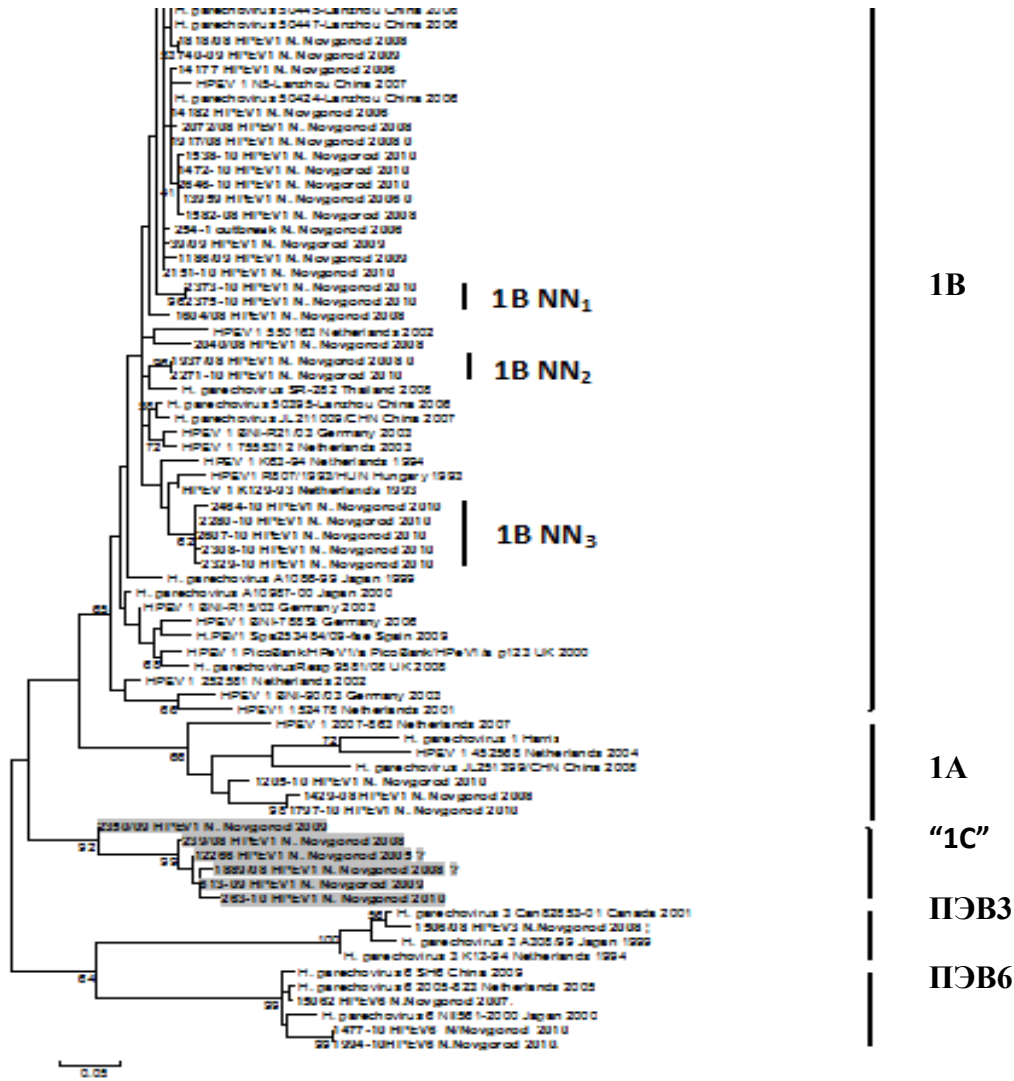


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидной последовательности фрагмента области VP3-VP1 генома ПЭВ 1-го типа.

Шесть ПЭВ 1-го типа, выявленных в Нижнем Новгороде в 2005, 2008-2010 гг., сформировали отдельный кластер. Дивергенция нуклеотидных последовательностей этих вирусов от последовательностей вирусов генотипа 1А составила 18,3-25,0 %, от последовательностей генотипа 1В – 14,0-23,5%. Такие различия дали основание выделить новый третий генотип ПЭВ 1-го типа, условно названный – 1С. При построении филогенетического дерева, основанного на анализе 5'НТР генома, эти шесть ПЭВ 1-го типа также образовали отдельную группу.

Таким образом, в результате филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 5'НТР и VP1 генома показано генетическое разнообразие ПЭВ 1-го типа, выявленных в Нижнем Новгороде в 2005-2010 гг.; идентифицированы два известных генотипа ПЭВ 1-го типа (1А, 1В); показана циркуляция ПЭВ 1В типа, относящихся к разным филогенетическим линиям; обнаружен вариант ПЭВ 1-го типа, который на основании высокого уровня дивергенции нуклеотидных последовательностей двух областей генома (5'НТР и области VP3-VP1) может быть охарактеризован, как новый 1С генотип ПЭВ.

3.2 Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей фрагментов капсидных белков VP3 и VP1

Полипептиды VP1 и VP3, образующие белковый капсид парэховирусов, содержат аминокислотные последовательности, определяющие серотип вируса, и домены, связывающие протомеры капсида [Joki-Korpela P., 2000].

Использованный нами способ генотипирования ПЭВ методом секвенирования основан на амплификации фрагмента области генома, кодирующей С-конец VP3 и N-конец VP1 [Harvala et al., 2008]. С целью изучения вариабельности аминокислотных последовательностей фрагментов этих белков, установленные нуклеотидные последовательности были переведены в соответствующие аминокислотные последовательности в программе Mega v.5.0.

При сравнительном анализе первичной структуры фрагмента VP3, установлены консерватизм аминокислотных последовательностей, принадлежащих разным генотипам ПЭВ 1-го типа, включая генотип 1С, и значительная вариабельность среди последовательностей ПЭВ, принадлежащих разным типам (рис.4). Белок VP3 у парэховирусов несет антигенные детерминанты и является основным белком, стимулирующим выработку протективных антител класса IgG [Alho A., 2003]. Такая функциональная нагрузка требует стабильной структуры белка в пределах серологического типа, что мы и наблюдаем в нашем исследовании.

Генотип	Штамм	год	1 Аминокислотная последовательность N-концевого участка VP1 34																																				
			N	S	W	G	S	Q	M	D	L	T	D	P	L	C	I	E	D	D	-	T	E	N	C	K	Q	T	M	S	P	N	E	L	G	L	T		
1A	Harris США	1957	N	S	W	G	S	Q	M	D	L	T	D	P	L	C	I	E	D	D	-	T	E	N	C	K	Q	T	M	S	P	N	E	L	G	L	T		
	452568 Голландия	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1205/10 Н. Новгород	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1B	K129-93 Голландия	1993	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	50445-Lanzhou Китай	2006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1937/08 Н.Новгород	2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1186/10 Н.Новгород	2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R807/1993/HUN Венгрия	1993	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	V	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1818/08 Н.Новгород	2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	V	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	740/09 Н.Новгород	2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	V	-	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2151/10 Н.Новгород	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	R	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2156/10 Н.Новгород	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	E	S	-	A	R	E	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2373/10 Н.Новгород	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2375/10 Н.Новгород	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	L	E	S	-	A	-	E	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"1C"	122666 Н.Новгород	2005	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-		
	239/08 Н.Новгород	2008	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1889/08 Н.Новгород	2008	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-		
	613/09 Н.Новгород	2009	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-		
	2350/09 Н.Новгород	2009	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-		
	263/10 Н.Новгород	2010	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	A	-	E	-	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-		

Рис. 5. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей N-конца VP1 штаммов ПЭВ 1-го типа.

На рисунке 5 видно, что на данном участке VP1 наблюдается значительная вариабельность аминокислотной последовательности внутри одного типа парэховирусов. Так последовательности штаммов парэховирусов генотипа 1С отличались от последовательности парэховирусов 1А на 6 аминокислот – дивергенция составила 22,0%. Теоретический анализ свидетельствует, что все замены сбалансированы по заряду. Аминокислотная последовательность N-конца VP1 генотипа 1С отличалась от 1В на 5 аминокислот – дивергенция составила 17,6%. Теоретически все замены также сбалансированы по заряду.

Таким образом, имеющиеся замены аминокислот не изменили общий заряд N-концевого участка белка VP1, который по расчетам, проведенным в программе Protein (Lasergene), равен -6,14 и остался одинаков для аминокислотных последовательностей всех трех генотипов вируса. В то же

время, замены аминокислот повлияли на вторичную структуру данного участка – генотип 1А отличается от генотипов 1В и 1С. Вторичная структура N-концевого участка белка VP1 генотипов 1В и 1С практически одинакова. Это позволяет сделать вывод, что имеющиеся аминокислотные замены в N-концевом участке белка VP1 у генотипа 1С практически не влияют на заряд фрагмента и его вторичную структуру и, по всей вероятности, не влияют на его функциональную роль, поскольку биохимические свойства данного фрагмента соответствуют таковым N-конца VP1 наиболее распространенного генотипа 1В. В связи с этим очевидно, что речь может идти только о представительской роли уникальной аминокислотной последовательности (NAEESKQSI) N-концевого участка VP1 в позициях 18-26 в качестве биохимического маркера нового генотипа 1С парэховирусов 1-го типа.

ВЫВОДЫ

- 1) Оптимизирован и апробирован метод выявления РНК парэховирусов человека разных генотипов с использованием ПЦР 5'НТР генома, показана эффективность его применения для обнаружения современных штаммов ПЭВ, циркулирующих на территории РФ. Впервые установлена частота обнаружения ПЭВ у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде (3,5-10,4% в разные годы).
- 2) Разработан метод идентификации ПЭВ 1-го, 3-го и 6-го типов на основе двухраундовой «гнездовой» ПЦР с использованием которого показано доминирование ПЭВ 1-го типа.
- 3) По результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов области VP3-VP1 генома российских (Н. Новгород) ПЭВ установлено существование 3-х генотипов (1А, 1В и 1С) ПЭВ 1-го типа.
- 4) Идентифицирован новый генотип 1С парэховирусов человека 1-го типа на основании различий в нуклеотидных (14,0-25,0%) и аминокислотных (11,2-24,1%) последовательностях.

- 5) Установлена высокая типоспецифическая консервативность С-концевого участка белка VP3, свидетельствующая о его важной роли в цикле репродукции парэховирусов.
- 6) Показано, что N-концевой участок характеризуется уникальной аминокислотной последовательностью (NAEESKQSI) в позициях 18-26 может служить биохимическим маркером нового 1С генотипа ПЭВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Зверев В.В.** Полимеразная цепная реакция для идентификации парэховирусов человека / Зверев В.В., Голицына Л.Н., Епифанова Н.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А. // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2010, № 3, С. 107-111.
2. **Зверев В.В.** Генотипирование парэховирусов методом ПЦР / Зверев В.В., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Парфенова О.В., Новиков Д.В., Луковникова Л.Б., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. // Медицинский альманах, 2010, № 2, С. 260-262.
3. **Зверев В.В.** Молекулярно-биологические методы идентификации парэховирусов и их разнообразие / Зверев В.В., Новикова Н.А. // Медицинский альманах. 2011. №4. С. 71-73.

II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и всероссийских конференций:

1. **Зверев В.В.** Разработка «nested»-варианта метода ОТ-ПЦР для обнаружения парэховирусов человека // Фундаментальная наука и клиническая медицина. Материалы Десятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» С.-Петербург, 20-21 апреля 2007 г. С.-Петербург, 2007, С. 160-161.
2. Голицына Л.Н. Генетическое разнообразие парэховирусов, обнаруженных у детей с острой кишечной инфекцией / Голицына Л.Н., **Зверев В.В.**, Фомина

С.Г., Луковникова Л.Б., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. // Сборник трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2007», Москва, 28-30 ноября 2007 г. Москва, 2007, Т. III, С. 203-204.

3. **Зверев В.В.** Идентификация парэховирусов человека молекулярно-генетическими методами // Докл. XIII нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины) Нижегородская область, Татинец, 20-25 апреля 2008 г. Н.Новгород.

4. **Зверев В.В.** Парэховирусы человека и парэховирусная инфекция / Зверев В.В., Голицына Л.Н., Новикова Н.А. // Материалы юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика и.н. Блохиной и 20-летию Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД. – Н.Новгород: , 2009, С.140-143.

5. **Зверев В.В.** Определение типа парэховирусов человека, циркулирующих в Нижнем Новгороде, методом ПЦР // Материалы XII медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина», С.-Петербург, 18 апреля 2009 г., С.-Петербург, 2009, С. 136-137.

6. **Зверев В.В.** Определение нового генотипа парэховирусов 1 типа на основе анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей / Зверев В.В., Голицына Л.Н., Новикова Н.А. // Материалы IV Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным заболеваниям. Москва, 26-28 марта 2012 г. М., 2012, С. 150.

7. Голицына Л.Н. Геноварианты парэховирусов человека 1 типа, идентифицированные в Нижнем Новгороде в 2005-2009 гг. / Голицына Л.Н., **Зверев В.В.**, Фомина С.Г., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.// Материалы научно-практической конференции молодых ученых Роспотребнадзора, посвященной 90-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной, 20-21 апреля 2011 г., Нижний Новгород. Нижний Новгород. 2011. С.49-53.

