

М. А. Ермолович¹, Г. В. Семейко¹,
Е. О. Самойлович¹, В. В. Хрусталеv²

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВАРИАНТОВ ПАРВОВИРУСА B19, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В БЕЛАРУСИ В 2017–2018 гг.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии, Минск¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

Парвовирусная инфекция человека широко распространена в Беларуси. При молекулярно-генетическом изучении возбудителя парвовируса B19 (B19P) в стране ранее была выявлена коциркуляция двух его генетических вариантов, 1a1 и 1a2, с преобладанием в разные годы одного из них. Цель данной работы – анализ генотипического разнообразия B19P, циркулировавших в стране в период спада заболеваемости в 2017–2018 года.

Секвенирование NS1/VP1 и области генома длиной 994 н.о. проведено для 21 штамма B19P из всех регионов страны. Для дополнительного анализа филогенетических взаимоотношений использованы 608 нуклеотидных последовательностей B19P субгенотипа 1a из международной базы данных ГенБанк.

В 2017–2018 гг. все B19P в Беларуси принадлежали к субгенотипу 1a и включали оба известных геноварианта – 1a1 и 1a2. В 2017 и 2018 г. на долю 1a1 пришлось 18,2 % и 10,0 % штаммов, 1a2 доминировал, представляя 54,5 % и 90,0 % штаммов, соответственно. В 2017 г. впервые было выявлено 3 (27,3 %) штамма, которые принадлежали субгенотипу 1a, но не относились ни к одному из известных геновариантов. Филогенетическая реконструкция, включавшая все представленные в Генбанке последовательности субгенотипа 1a, показала, что еще 14 штаммов группируются вместе с белорусскими B19P, образуя отдельную ветвь, предварительно названную как новый геновариант 1a3. Уровень генетических различий между новым геновариантом 1a3 и каждым из двух известных геновариантов 1a1 и 1a2 превышал различия между ними (1,99 % и 2,22 % против 1,59 %).

Таким образом, снижение заболеваемости парвовирусной инфекцией в 2017–2018 гг., сменившее эпидемический подъем предшествующих двух лет, характеризовалось сохранением доминирующего положения в циркуляции геноварианта 1a2. Выявленный новый геновариант подтверждает, что генетическое разнообразие B19P является более высоким, чем это считалось ранее, и может потребовать внесения изменений в существующую классификацию.

Ключевые слова: парвовирус B19 (эритропарвовирус приматов 1), субгенотип 1a, филогенетическая реконструкция.

**M. A. Yermalovich, G. V. Semeiko,
E. O. Samoilovich, V. V. Khrustalev**

DIVERSITY OF PARVOVIRUS B19 GENOVARIANTS CIRCULATED IN BELARUS IN 2017–2018

Human parvovirus infection is widespread in Belarus. Previous molecular studies revealed co-circulation of two genetic variants parvovirus B19 (B19P), 1a1 and 1a2, with one of them dominated in individual years. The purpose of the work is to analyze the genotypic diversity of B19P circulating in the country in 2017–2018, at the time of decrease in incidence.

Sequencing of 994 bp in NS1/VP1u genome region was conducted for 21 B19Ps from all regions of Belarus. For additional phylogenetic reconstruction, 608 nucleotide sequences of B19P subgenotype 1a from GenBank were used.

In 2017–2018 all B19Ps in Belarus belonged to subgenotype 1a and included both known subtypes – 1a1 and 1a2. In 2017 and 2018, 1a1 accounted for 18.2 % and 10.0 % of the strains, respectively; 1a2 dominated, representing 54.5 % and 90.0 % of the strains, respectively. In 2017, for the first time in Belarus, 3 (27.3 %) strains were identified that belonged to subgenotype 1a but did not clustered with any of the known subtypes. Phylogenetic reconstruction including all B19P subgenotype 1a sequences from Genebank, showed that another 14 strains are grouped together with the Belarusian strains forming a separate branch tentatively named as a new subtype 1a3. Genetic differences between the new subtype 1a3 and each of the well-known subtype 1a1 and 1a2 exceeded the differences between them (1.99 % and 2.22 % versus 1.59 %).

Thus, the decrease in the incidence in 2017–2018, followed the epidemic rise in the previous two years, occurred with continued dominance of subtype 1a2. The new revealed subtype confirms higher genetic diversity of B19P than previously thought and may require changes to the existing classification.

Key words: *parvovirus B19 (erythroparvovirus primates 1), subgenotype 1a, phylogenetic reconstruction.*

П арвовирусная инфекция человека (ПВИ) имеет пубиквитарное распространение и широкий круг клинических проявлений. В Беларуси официальная регистрация этого заболевания отсутствует, однако данные лабораторной верификации диагноза свидетельствуют о том, что им обусловлено около 30 % случаев заболевания, сопровождающихся острой макулопапулезной сыпью [10]. В Бельгии, Финляндии, Англии и Уэльсе, Италии подъемы заболеваемости ПВИ регистрируются преимущественно каждые 5–6 лет [5], однако в Беларуси при проведении надзора за ПВИ начиная с 2005 г. был установлен более длительный эпидемический цикл, составлявший 9 лет [1].

У возбудителя ПВИ, парвовируса B19 (B19P), в настоящее время установлено наличие трех генотипов (1, 2, 3), каждый из которых включает по два субгенотипа (a и b) [8]. Наибольшее распространение в мире имеет генотип 1, для которого внутри субгенотипа 1a было выделено два геноварианта: 1a1 и 1a2 [4].

Генотипирование B19P проводится в Беларуси с 2005 г., и в течение всех лет наблюдения в стране циркулировали оба геноварианта субгенотипа 1a, 1a1 и 1a2 [2]. Геновариант 1a1 имел преимущественное распространение в течение длительного периода низкой заболеваемости (2009–2012). Доминирование в циркуляции 1a2 наблюдалось в годы подъема заболеваемости (2005–2006 и 2014–2016). В 2007–2008 гг., на фоне резкого снижения заболеваемости, наибольшее распространение в стране все еще продолжал иметь геновариант 1a2. Поскольку очередной подъем заболеваемости закончился в 2016 г., то представляло интерес проследить, произошло ли изменение генотипического состава возбудителя одновременно со спадом заболеваемости, или доминировавший вариант все еще имел широкое распространение, как это наблюдалось и после 2006 г.

Цель данного исследования – на основе секвенирования фрагмента генома NS1/VP1u длиной 994 н.о. провести генотипирование B19P, циркулировавших в Беларуси в период 2017–2018 гг.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности фрагмента генома B19P были получены из образцов сыворотки крови пациентов с лабораторно верифицированной ПВИ из всех регионов Беларуси. ДНК выделяли из 200 мкл сыворотки крови с использованием набора QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venlo, Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию проводили в двухстадийной гнездовой ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров e1855f, e1863f, B19-R1 and B19-R2, позволяющих получить фрагмент длиной 1100 н.о. NS1/VP1u области генома [3, 8]. Продукты амплификации анализировали в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромида этидия. ПЦР-продукт для секвенирования очищали с использованием набора для очистки QIAquick PCR (Qiagen, Германия).

Секвенирование выполняли на капиллярном секвенаторе 3500 (Applied Biosystems, США) с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 cycle (Life Technologies, США) и праймеров для второго раунда амплификации. Редактирование нуклеотидных последовательностей проводили в программе SeqScape® v.3.0 (Life Technologies, США).

Для генотипирования выполняли филогенетический анализ фрагментов генома длиной 994 н.о. области NS1/VP1u (515 н.о. NS1 и 487 н.о. VP1u с перекрывающейся областью размером 8 н.о.) с использованием программы MEGA версии 10 на основании алгоритма Neighbor Joining и Kimura 2-параметрической модели. Значимой считали величину бутстреп ≥ 70 % (1000 повторов).

Результаты и обсуждение

За период 2017–2018 гг. в Беларуси был генотипирован 21 штамм В19Р, в том числе 11 – в 2017 г. и 10 – в 2018 г. Все циркулировавшие в этот период В19Р относились к субгенотипу 1а и были представлены несколькими геновариантами (рис. 1). К геноварианту 1а1 относились лишь 18,2 % (2/11) штаммов в 2017 г. и 10,0 % (1/10) штаммов в 2018 г. Геновариантом 1а2, доминировавшим в период подъема заболеваемости в 2014–2016 гг. [Ерм., 2019], по-прежнему было представлено большинство штаммов: 54,6 % (6/11) в 2017 г. и 90,0 % (9/10) в 2018 г. (рис. 1).

В целом, известными на сегодняшний день геновариантами 1а1 и 1а2 были представлены 18 из 21 ге-

нотипированных В19Р. В 2017 г. впервые на территории Беларуси было выявлено три штамма В19Р, которые четко относились к субгенотипу 1а, однако не кластеризовались ни с одним из известных геновариантов, а формировали на филогенетическом дереве дополнительную ветвь. Такие филогенетические взаимоотношения позволяли предположить наличие еще одного, нового, геноварианта, которому было дано предварительное наименование 1а3.

Для циркулировавших в 2017–2018 гг. вирусов геноварианта 1а1 генетическое разнообразие составляло 0,85 %, для геноварианта 1а2 – 0,83 %, для нового геноварианта, представленного двумя вариантами нуклеотидных последовательностей, оно было наименьшим – 0,13 %. Среднее генетическое

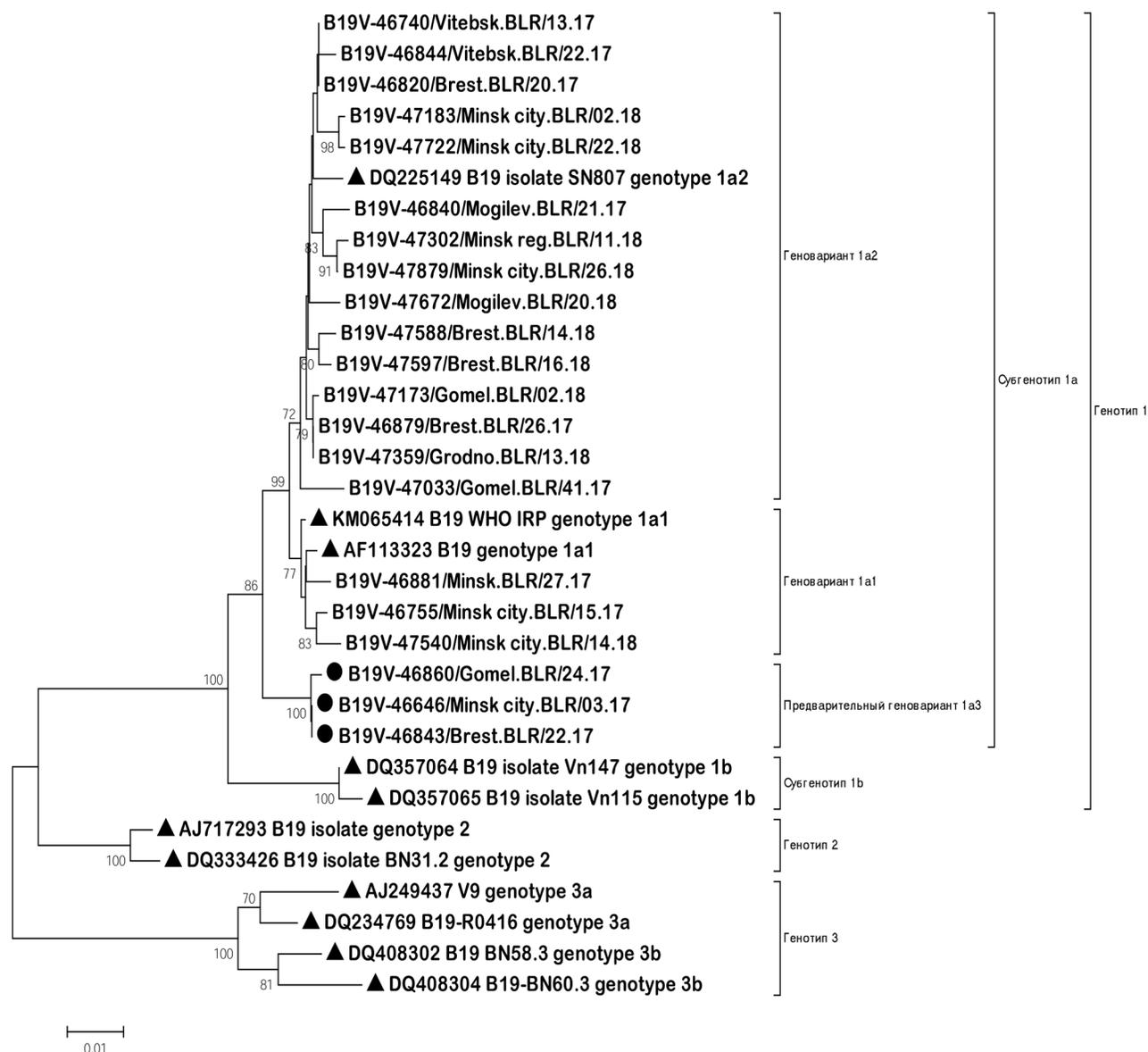


Рисунок 1. Филогенетическое дерево на основе 994 н.о. NS1/VP1u региона парвовирусов В19, циркулировавших в Беларуси в 2017–2018 гг., а также референс-штаммов генотипов 1, 2 и 3. Референс-штаммы отмечены черным треугольником; белорусские штаммы, формирующие предварительно новый геновариант, отмечены черным кружком

расстояние между этими группами вирусов так же было небольшим, однако между 1a1 и 1a2 оно составляло 1,56 % и было существенно выше между каждой из них и новым геновариантом: 1,99 и 2,22 %, соответственно.

Для подтверждения существования нового геноварианта был проведен анализ филогенетических взаимоотношений последовательностей B19P субгенотипа 1a, включая все представленные в международной базе данных ГенБанк (фрагмент 994 н.о. области NS1/VP1u, 608 последовательностей, ноябрь 2019 г.) и «новые» белорусские B19P. С целью определения

оптимальной модели филогенетического анализа был использован Model test, встроенный в программу MEGA10. Согласно этому тесту, модель с наименьшим значением BIC (Bayesian Information Criterion – Байесовский информационный критерий), считается наиболее подходящей для анализа данной выборки нуклеотидных последовательностей. В соответствии с полученными результатами была выбрана 3-параметрическая модель Тамура с Гамма-распределением (T92+G).

Полученные результаты показали, что лишь несколько последовательностей из Кыргызстана (Ош – 3,

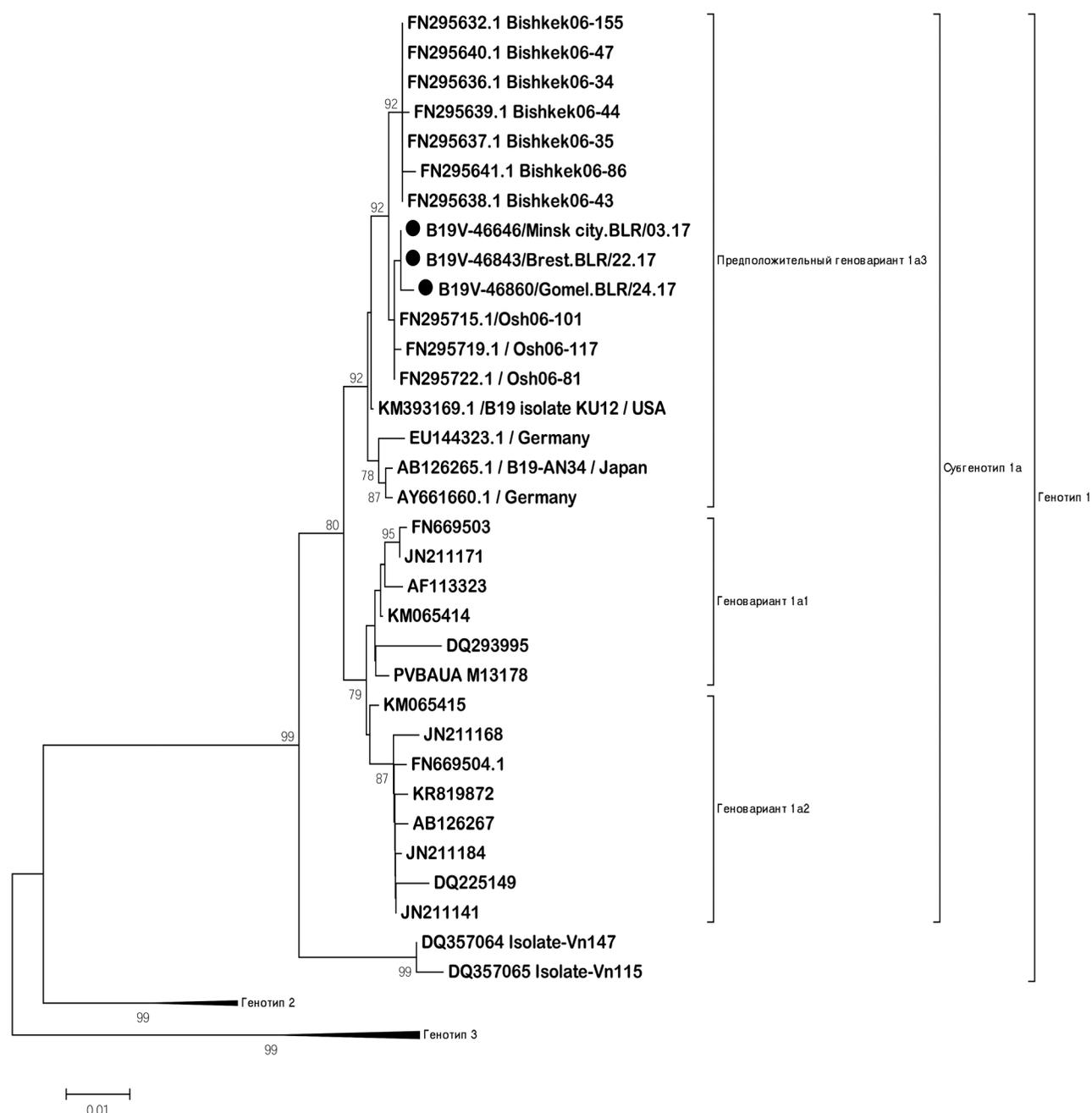


Рисунок 2. Филогенетическое дерево на основе 994 н.о. области NS1/VP1u, включающее все доступные в Genbank последовательности, формирующие вместе со штаммами из Беларуси предполагаемый геновариант 1a3. Последовательности из Беларуси отмечены черным кружком

Бишкек – 7), США (1), Японии (1) и Германии (2) группировались с «новыми» штаммами из Беларуси, образуя четко различимый кластер в рамках субгенотипа 1a (рис. 2). Наибольшее сходство «новые» белорусские В19Р имели со штаммами, выявленными в Кыргызстане в 2006 г., нуклеотидные последовательности которых были депонированы в ГенБанк вирусологами из Люксембурга при однократном исследовании ими образцов из этой страны. Никакой информации о генотипическом составе В19Р, циркулировавших в Кыргызстане ранее и в последующие годы, в доступных источниках не представлено, однако нельзя исключить, что за прошедшие годы эти вирусы претерпели определенные изменения и затем были импортированы Беларусь. К сожалению, никаких эпидемиологических данных о поездках в Кыргызстан белорусских пациентов, от которых были получены эти вирусы, не имеется, однако тесные связи между нашими странами говорят в пользу такой возможности.

Хотя наибольшее количество штаммов «нового» геноварианта 1a3 получено в Кыргызстане, в этот же период (2006 г.), согласно помещенным в Генбанк последовательностям, в стране циркулировали В19Р и других геновариантов (1a1), и имеющихся данных недостаточно, чтобы сделать заключение об их эпидемиологической значимости (например, связь со вспышками или стадией эпидемического процесса).

Анализ имеющейся в ГенБанке информации и представленных в литературе данных об этих нуклеотидных последовательностях свидетельствуют о том, что В19Р, относящиеся к «новому» геноварианту 1a3, обнаруживались в разных регионах мира на протяжении достаточного долгого времени. В Германии нуклеотидные последовательности «нового» геноварианта были выявлены в препаратах факторов свёртывания крови, произведенных из пулов образцов плазмы доноров или в образцах ткани печени у лиц с трансплантацией этого органа или аутопсийных образцах [6, 7]. Поскольку в этих же препаратах была обнаружена и ДНК генотипа 2, который в настоящее время практически не циркулирует нигде в мире, нельзя с уверенностью утверждать, был ли донор, имеющий «новый» геновариант В19Р, инфицирован в период проведения исследования или за много лет до того.

Единственной страной, где В19Р, отнесенные к «новому» геноварианту 1a3, были описаны как доминирующие, является Япония. С ними связывают подъём заболеваемости ПВИ в г. Осака в 1986–1987 гг. [9]. В Беларуси в течение 2017 г. три штамма этого геноварианта были выявлены в разных частях страны (в Минске в январе, в Бресте в мае, в Гомеле в июне), однако дальнейшего распространения они не получили, и в 2018 г. не было обнаружено ни одного подобного В19Р.

Несомненно, проведение более широких исследований в разных странах мира, в том числе охва-

тывающих и «молчащие» территории, позволят получить более полное представление об истинной распространенности этого геноварианта В19Р.

Таким образом, все генотипированные в 2017–2018 гг. в Беларуси В19Р принадлежали к субгенотипу 1a и включали оба известных на сегодняшний день геноварианта – 1a1 и 1a2. В 2017 и 2018 гг. на долю 1a1 пришлось 18,2 % и 10,0 % штаммов, на долю 1a2 – 54,5 % и 90,0 % штаммов, соответственно. Таким образом, снижение заболеваемости парвовирусной инфекцией в 2017–2018 гг., сменившее эпидемический подъем предшествующих двух лет, характеризовалось сохранением доминирующего положения в циркуляции геноварианта 1a2.

В 2017 г. в Беларуси впервые было выявлено 3 штамма субгенотипа 1a, которые не кластеризовались ни с одним из известных геновариантов 1a1 или 1a2. Филогенетический анализ, включавший все представленные в Генбанке нуклеотидные последовательности субгенотипа 1a с охватом региона 994 н.о. NS1/VP1u, показал, что вместе с белорусскими В19Р группируются еще 14 штаммов, образуя отдельную ветвь, предварительно названную как новый геновариант 1a3.

Дальнейшего распространения в Беларуси данный вариант В19Р не получил, однако то, что в разные годы он обнаруживался в разных частях мира, требует проведения более широких исследований для уточнения его эпидемиологической значимости. Более высокий уровень генетических различий между новым геновариантом 1a3 и каждым из двух широко распространённых геновариантов 1a1 и 1a2 (1,99 % и 2,22 % против 1,59 %) свидетельствует о том, что генетическое разнообразие В19Р является более высоким, чем это считалось ранее, и накопление дополнительных данных может потребовать внесения изменений в существующую классификацию этого вируса.

Литература

1. Ермолович, М. А., Дронина А. М., Самойлович Е. О., Пранович А. А., Шуманская С. Ю. Динамика эпидемического процесса парвовирусной инфекции в Республике Беларусь (2005–2016) // Журнал Гродн. гос. мед. ун-та. – 2017. – Т. 15 (4). – С. 414–417.
2. Ермолович, М. А., Семейко Г. В., Самойлович Е. О. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции, 2005–2016 годы // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 1. – С. 35–45.
3. Hübschen, J. M., Mihneva Z., Mentis A. F., Schneider F., Aboudy Y., Grossman Z., Rudich H., Kasymbekova K., Sarv I., Nedeljkovic J., Tahita M. C., Tarnagda Z., Ouedraogo J. B., Gerasimova A. G., Moskaleva T. N., Tikhonova N. T., Chitadze N., Forbi J. C., Faneye A. O., Otegbayo J. A., Charpentier E., Muller C. P. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47(11). – P. 3735–3738.

□ Оригинальные научные публикации

4. *Molenaar-de Backer, M. W., Lukashov V. V., van Binnendijk R. S., Boot H. J., Zaaijer H. L.* Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(8). – P. e43206.

5. *Mossong, J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., Siennicka J., Trzcinska A., VAN Damme P., Beutels P., Vyse A., Shkedy Z., Aerts M., Massari M., Gabutti G.* Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection // *Epidemiol. Infect.* – 2008. – Vol. 136. – P. 1059–1068.

6. *Schneider, B., Becker M., Brackmann H. H., Eis-Hübinger A. M.* Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2 // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 92(4). – P. 838–845.

7. *Schneider, B., Höne A., Tolba R. H., Fischer H. P., Blümel J., Eis-Hübinger A. M.* Simultaneous persistence

of multiple genome variants of human parvovirus B19 // *J. Gen. Virol.* – 2008. – Vol. 89 (Pt 1). – P. 164–176.

8. *Servant, A., Laperche S., Lallemand F., Marinho V., De Saint Maur G., Meritet J. F., Garbarg-Chenon A.* Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, № 18. – P. 9124–9134.

9. *Suzuki, M., Yoto Y., Ishikawa A., Tsutsumi H.* Analysis of Nucleotide Sequences of Human Parvovirus B19 Genome Reveals Two Different Modes of Evolution, a Gradual Alteration and a Sudden Replacement: a Retrospective Study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008 // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(21). – P. 10975–10980.

10. *Yermalovich, M. A., Hübschen J. M., Semeiko G. V. et al.* Human parvovirus B19 surveillance in patients with rash and fever from Belarus // *J. of Med. Virol.* – 2012. – Vol. 84. – P. 973–978.