

К. Л. Дедюля, Н. В. Поклонская, З. Ф. Богуш, С. К. Лозюк,
С. А. Аринович, Т. В. Амвросьева

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ВК И JC ПОЛИОМАВИРУСОВ

ГУ«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, лаборатория инфекций
с природным резервуаром, г. Минск

В статье представлены результаты филогенетического анализа ВК и JC вирусов, идентифицированных у белорусских пациентов в 2014–15 гг. Показана принадлежность исследуемых ВК вирусов к субгруппам Ib-2 и IVc, вирусов JC – к субтипам I и IVc. Исследование подтверждает, что данные генотипы полиомавирусов широко распространены на территории Европы.

Ключевые слова: полиомавирус, филогенетический анализ, субтип.

K. L. Dziadziulia, N. V. Paklonskaya, Z. F. Bogush, S. K. Laziuk, T. V. Amvrosieva

GENOTYPING OF BK AND JC POLYOMAVIRUSES CIRCULATING IN BELARUS

The study presents the results of phylogenetic analysis of BK and JC viruses isolated from patients in Republic of Belarus. Described BK isolates belong to subgroups Ib-2 and IVc. Other hand, Byelorussian's JC polyomaviruses belong to I and IVc subtypes.

Key words: Polyomavirus, phylogenetic analysis, subtype.

Полиомавирусы (ПВ) представляют собой мелкие безоболочечные ДНК-содержащие вирусы, широко распространенные среди людей. В настоящее время известно 14 типов ПВ человека. Наиболее полно изучены два представителя рода *Polyomavirus* – ВК- и JC полиомавирусы. Во время первичной инфекции вирусы распространяются по организму и затем пожизненно сохраняются в нем в латентном состоянии. Основными мишенями персистентной ВК вирусной инфекции являются клетки почек и мочевыводящих путей. JC вирус также использует почечные канальцы как место своей персистенции. [1–3]. Пожизненная персистенция ПВ не представляет клинической уг-

розы для иммунокомпетентного хозяина, несмотря на остаточный уровень экспрессии вирусных генов. Однако их спорадическая реактивация приводит к ограниченной вирусной репликации, которая наблюдается у 0,5–20% здоровых серопозитивных лиц. При этом гистопатологические изменения в почечной паренхиме отсутствуют, и функция почек остается неизменной. Значительное увеличение вирусной активности, приводящее к развитию заболевания, происходит, преимущественно, при относительной или абсолютной иммуносупрессии [2–3]. Повышение частоты полиомавирусной вирусии наблюдается у ВИЧ-инфицированных и реципиентов органов и клеток. Реактивация ВК ви-

русной инфекции в клетках урогенитального тракта и почек приводит к развитию патологических изменений у пострадавших лиц. Это состояние сегодня известно, как полиомавирус-ассоциированная нефропатия (ПВАН) [1–6]. В случае наличия JC вирусной инфекции патологические изменения происходят в ЦНС и приводят к развитию прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии [1–3, 7–8].

Внимание ученых ПВ привлекли сравнительно недавно, когда был установлен их значительный вклад в развитие тяжелых патологий при иммуносупрессии. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по молекулярной эволюции ПВ, предлагаются варианты классификации, выдвигаются различные гипотезы относительно их совместной эволюции с человечеством.

Основываясь на нуклеотидной вариабельности гена капсидного белка VP1, штаммы ВК вирусов классифицируются на 4 субтипа (I – IV). По результатам филогенетического анализа, представленного в публикациях авторов из разных стран, можно судить о географической распространенности того или иного субтипа ВК вируса. К примеру, субтип I широко распространен во всех регионах мира, тогда как субтип IV является менее распространенным, а субтипы II и III еще более редки [4–6]. При этом субтип I делится на ряд субгрупп (Ia, Ib-1, Ib-2, и Ic). Данные филогенетического анализа изолятов субтипа IV показали его разделение на 6 отдельных субгрупп (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1 и IV/c-2) [4–6]. Следует отметить и различную географическую распространенность субгрупп внутри субтипа I. Так, субгруппа Ia широко распространена в Африке, субгруппа Ib-1 – в Юго-Восточной Азии, в США, Европе, Японии, субгруппа Ib-2 – в Европе и Западной Азии, субгруппа Ic – в Северо-Восточной Азии [4–6].

Несмотря на то, что штаммы JC вируса составляют один серотип, геномный анализ путем секвенирования основного капсидного белка VP1 позволил классифицировать его на восемь различных генотипов и целый ряд субтипов, имеющих определенные различия в их географическом распространении [7–8]. Очень близкие друг другу генотипы 1 и 4 распространены среди европейцев и европейских эмигрантов в США [9–12]. Генотипы 3 и 6 являются африканскими и регистрируются, в частности, в Танзании и Гане. Генотипы 2 и 7 имеют широкое географическое распространение. Субтип 2A, в основном, обнаруживается в японской популяции и среди коренных американцев, 2B субтип – среди евразийцев, 2D субтип – в индийской, а 2E субтип – в австралийской и западной тихоокеанской популяции. Субтипы 7A и 7B

обнаружены в Китае, Юго-восточной Азии, Японии и Монголии. Генотип 8 распространен в Папуа-Новой Гвинее и на тихоокеанских островах [7–8].

Несмотря на интенсивные зарубежные работы по молекулярной эпидемиологии полиомавирусов, до начала настоящих исследований данные о субтиповом составе циркулирующих в Республике Беларусь ВК и JC вирусов отсутствовали.

Настоящая работа посвящена изучению генотипического состава ВК и JC вирусов, идентифицированных в клиническом материале белорусских реципиентов почки.

Материалы и методы. Исследовано 39 образцов мочи от 39 реципиентов почки, которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» в период с 2014 по 2016 год.

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («Амплисенс», Россия). Для выделения вирусных нуклеиновых кислот применяли коммерческий набор «РИБО-сорб» («Амплисенс», Россия), в соответствии с инструкцией производителя.

Для секвенирования участков генома ВК и JC вирусов использовали 434 нт. фрагмент, локализованный в гене VP1, который накапливали при помощи универсальной для обоих полиомавирусов пары праймеров PoE1s и PoE2as [3]. Секвенирование участков ДНК проводили методом терминации цепи в термоциклической реакции на ДНК-анализаторе CEQ8000 с использованием коммерческого набора DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [9]. Для множественного выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей, а также последовательностей из базы данных Entrez использовали алгоритм ClustalW, встроенный в программу MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версии 6 [10]. Полученные выравнивания корректировали вручную. Определение оптимальной математической модели нуклеотидных замен проводили методом максимального правдоподобия с использованием скорректированного информационного критерия Акаике (AICc). Модель с минимальным значением AICc была выбрана в качестве оптимальной. Для филогенетической реконструкции использовали метод присоединения ближайшего соседа (neighbor-joining, NJ) [10] имплементированный в MEGA 6.0. Достоверность значений генетических расстояний (стандартную ошибку) и топологии филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (bootstrap-test).

Для оценки достоверности генетических расстояний и топологии каждой дендрограммы анализировали 1000 псевдореplik.

Результаты и обсуждение. По данным литературы в основе филогенетического анализа человеческих полиомавирусов и, в частности, ВК и JC вирусов, лежит секвенирование фрагмента гена, кодирующего капсидный белок VP1 [3]. Экспериментально определены оптимальные условия амплификации с используемыми праймерами (PoE1s и PoE2as): 95°-20 сек, 50°-45 сек, 72°-10 сек, 35 циклов амплификации.

Аmplифицированные фрагменты ДНК 25 ВК вирусов и 14 JC вирусов секвенированы и отредактированы вручную. Для филогенетического анализа взяты фрагменты длиной в 314 п.о. в случае ВК вирусов и 364 п.о. для JC вирусов. Полученные регионы проанализированы для определения оптимального алгоритма генотипирования. Выбор

оптимальной модели эволюции проводили с помощью программы MEGA 6.06, в которой рассчитывали значения максимального правдоподобия для 24 математических моделей нуклеотидных замен. При помощи программы были рассчитаны показатели AICс для сравнения значений максимального правдоподобия для каждой из моделей. Полученные результаты показали, что оптимальными моделями нуклеотидных замен для филогенетической реконструкции на основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 ВК вируса была 3-параметрическая модель Тамуры, для вирусов JC – модель Джукса-Кантора.

Далее методом NJ была осуществлена филогенетическая реконструкция по исследуемым регионам генома. Помимо анализируемых нуклеотидных последовательностей белорусских ВК вирусов, в анализ были включены нуклеотидные последовательности 18 штаммов ВК вирусов различных субтипов из Международного генбанка (National Center for Biotechnology Information, NCBI), в том числе прототипные штаммы для субтипов I–IV.

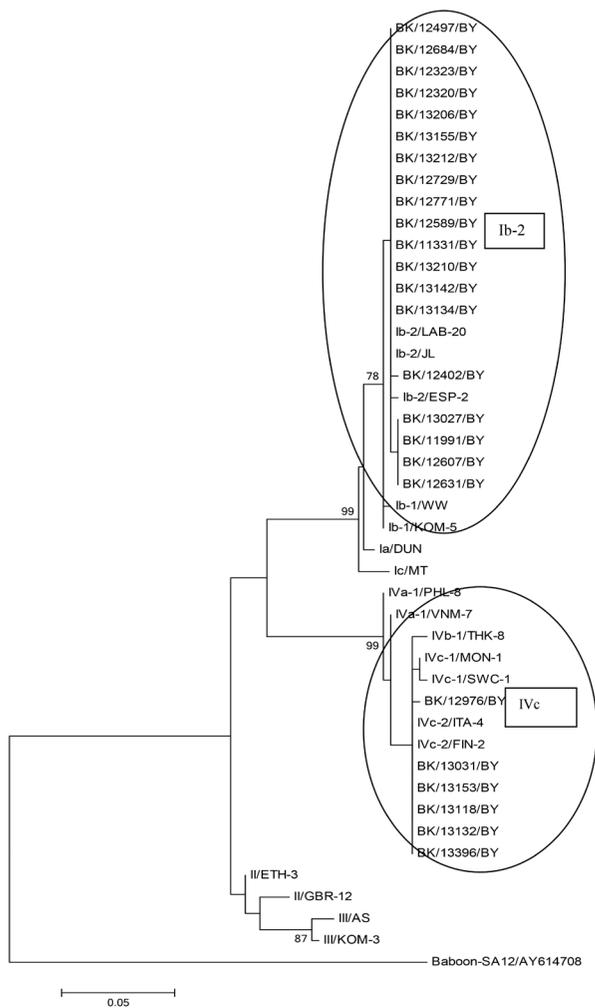


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании фрагмента гена VP1 ВК вируса методом NJ. Цифры в узлах древа – значения бутстреп-теста

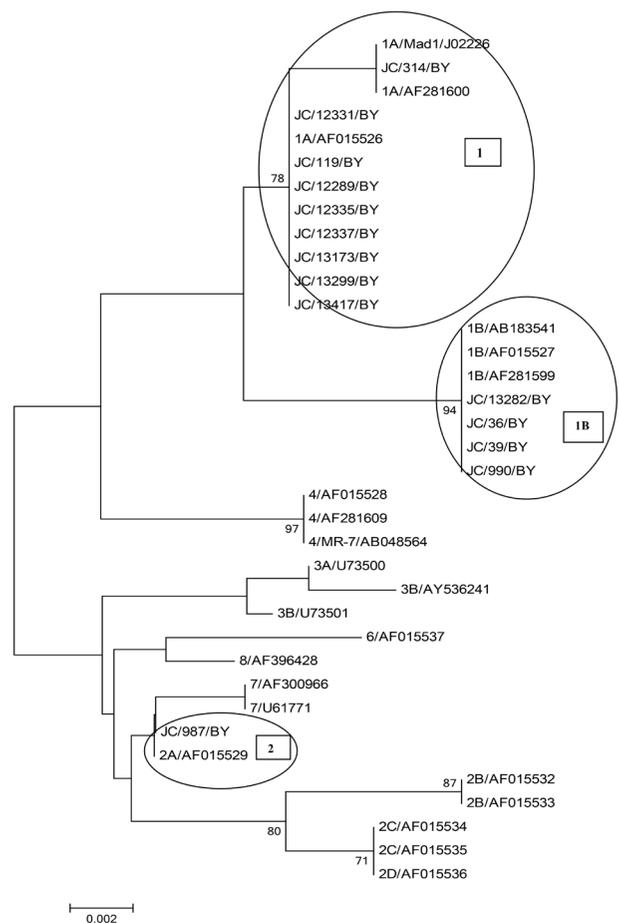


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основании фрагмента гена VP1 JC вируса методом NJ. Цифры в узлах древа – значения бутстреп-теста

В качестве внешней группы использовали соответствующие фрагменты генома полиомавируса желтого бабуина. Для филогенетической реконструкции при исследовании нуклеотидных последовательностей белорусских JC вирусов в анализ были включены 22 последовательности прототипных штаммов из Международного генбанка.

Полученные результаты свидетельствовали о циркуляции на территории Республики Беларусь генотипов BK вирусов, принадлежащих к субгруппам Ib-2 и IVc (рисунок 1). Значение бутстреп-показателей для кластеров, в который вошли исследуемые нуклеотидные последовательности BK вирусов и прототипные штаммы, позволяют сделать статистически обоснованный вывод о принадлежности исследуемых нуклеотидных последовательностей к субтипам I и IVc, в частности, к субгруппам Ib-2, IVc-1 и IVc-2 данных субтипов.

Белорусские изоляты JC вирусов группировались в общий кластер с прототипными штаммами 1 и 2 типов (рисунок 2). С субтипом 1A группировалось 9 из 14 белорусских изолятов, с субтипом 1B – 4 изолята, с субтипом 2A – один изолят.

Таким образом, проведенный филогенетический анализ возбудителей полиомавирусной инфекции, обнаруженных у белорусских реципиентов почки, показал, что наиболее близкими к исследуемым BK вирусам были штаммы, циркулирующие в Ирландии (2011 год), Республике Казахстан (2010 год) и Японии (2007). В тоже время, наиболее генетически схожими с исследуемыми белорусскими JC вирусами были штаммы, циркулирующие в США, странах Европы, Ближнего Востока и Японии.

Литература

1. Knowles, W. A., Pipkin P., Andrews N., Vyse A., Minor P., Brown D. W., Miller E. / Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40 // J Med Virol. – 2003. – V. 71. – P. 115–123.
2. Easha, S., Manleyb K., Gasparovich M. / Human polyomaviruses: Molecular and clinical epidemiology // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – V. 63. – P. 865–876.
3. Chehadah, W. Nampoory M. R. / Genotypic diversity of polyomaviruses circulating among kidney transplant recipients in Kuwait // J Med Virol. – 2013. – V. 85. – P. 1624–1631.
4. Hirsch, H. H., Steiger J. / Polyomavirus BK // Lancet Infect Dis. – 2003. – V. 3. – P. 611–623.
5. Zhong, S., Randhawa P. S., Ikegaya H., Chen Q., Zheng H. Y., Suzuki M., Takeuchi T., Shibuya A., Kitamura T., Yogo Y. / Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race // Journal of General Virology – 2009. – V. 90. – P. 144–152.
6. Yogo, Y., Zhong S., Suzuki M., Shibuya A., Kitamura T. / Occurrence of the European Subgroup of Subtype I BK Polyomavirus in Japanese-Americans Suggests Transmission outside the Family // Journal of Virology – 2007. – V. 81(23). – P. 13254–13258.
7. Karalic, D., Lazarevic I., Knezevic A., Cupic M., Jevtovic D., Jovanovic T. / Distribution of JC Virus Genotypes Among Serbian Patients Infected With HIV and in Healthy Donors // J Med Virol. – 2014. – V. 86. – P. 411–418.
8. Agostini, H. T., Ryschkewitsch C. F., Stoner G. L. / JC virus Type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes // J Gen Virol. – 1998. – V. 79. – P. 801–805.
9. Altschul, S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. / Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. – 1990. – Vol. 215. – P. 403–410.
10. Tamura, K., Peterson D., Stecher G., Nei M., Kumar S. / MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. Evol. – 2011. – Vol. 28. – N 10. – P. 2731–2739.