

БОКАПАРВОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Н.В. Сивец, Н.П. Шмелева, Т.П. Лапо

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Bocaparvovirus infection in children in the republic of Belarus: molecular and epidemiological aspects

N.V. Sivets, N.P. Shmeleva, T.P. Lapo

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Резюме

Цель: изучить молекулярно-эпидемиологические аспекты бокапарвовирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь.

Материалы и методы: исследования проводились в рамках дозорного надзора за гриппом и другими возбудителями острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в период 2010–2018 гг. Исследовали назофарингеальных мазки (3907), сыворотки крови (149) госпитализированных детей от 0 до 18 лет с симптомами ОРВИ, а также лимфоэпителиальную ткань аденоидов методом ПЦР в реальном времени (Rotor Gene 6000, Corbett research, Австралия) на наличие ДНК/РНК респираторных вирусов: гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа, риновируса, аденовируса, бокапарвовируса и коронавируса. Полногеномное секвенирование ДНК бокапарвовируса проводили с использованием коммерческого набора «Genome Lab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США). Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Beckman Coulter «CEQ 8000» (Beckman Coulter, США).

Результаты: генетический материал респираторных вирусов выявлен в 2781 случае (71,2%). Бокапарвовирус был выявлен у 337 (12,1%) пациентов. При анализе внутригодовой динамики бокапарвовирусной инфекции отмечен подъем заболеваемости в осенний период. Наиболее восприимчивыми к данной инфекции являются дети в возрасте от 2 до 4 лет. Длительность вiremии у данных пациентов варьировала от 6 до 15 дней. Согласно данным филогенетического анализа, белорусские вирусы HBoV1BLR/Mogilev/241/14, HBoV1BLR/Minsk/10/14, HBoV1BLR/Minsk/11/14, HBoV1BLR/Gomel/285/15 объединялись в отдельную группу и показали генетическое родство с референс-вирусом ST2. Анализ первичной структуры белорусских бокапарвовирусов показал наличие ряда аминокислотных замен.

Заключение: бокапарвовирус стал четвертым вирусом по частоте встречаемости, наряду с другими респираторными вирусами. Бокапарвовирусная инфекция может иметь тяжелое течение. Все аминокислотные замены располагались в функционально-значимых регионах генома вируса.

Ключевые слова: бокапарвовирус человека, полимеразная цепная реакция, частота выявления, возрастная структура, сезонность, секвенирование, филогенетический анализ.

Abstract

Objective: To study molecular and epidemiological aspects bocaparvovirus infection at the hospitalized children in Republic of Belarus.

Materials and methods: the studies were as part of a sentinel surveillance of influenza and other agents of acute respiratory viral infections (ARVI) in the period 2010 – 2018. Investigated nasopharyngeal swabs (3907), serum (149) hospitalized children from 0 to 18 years with symptoms of ARVI, as well as lymphoepithelial tissue of adenoids by real-time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett research, Australia) for the presence of respiratory DNA/RNA viruses: influenza, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, rhinovirus, adenovirus, metapneumovirus, bocaparvovirus, and coronaviruses. The full genomic DNA sequencing of the bocaparvovirus was performed using the commercial kit «Genome Lab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter, USA). Electrophoresis and analysis of the reaction products were performed on a Beckman Coulter CEQ 8000 automated capillary DNA analyzer (Beckman Coulter, USA).

Results: the genetic material of respiratory viruses was detected in 2781 cases (71,2%). Bocaparvovirus was detected in 337 (12,1%) patients. Bocaparvovirus infection showed an increase in the incidence rate in the autumn period. The most susceptible to this infection are children aged 2 years to 4 years. The duration of viremia in these patients ranged from 6 to 15 days. Phylogenetic analysis, the Belarusian viruses HBoV1BLR/Mogilev/241/14, HBoV1BLR/Minsk/10/14, HBoV1BLR/Minsk/11/14, HBoV1BLR/Gomel/285/15 were combined into a separate group and showed genetic similarity with the ST2 virus. Analysis of the primary structure of the Belarusian bocaparvoviruses showed the presence of amino acid substitutions.

Conclusion: Bocaparvovirus became the fourth virus in frequency of occurrence along with other respiratory viruses. Bocaparvovirus infection may have a severe course. All amino acid substitutions were located in functionally significant regions of the virus genome.

Key words: human bocaparvovirus, polymerase chain reaction, detection rate, age structure, seasonality, sequencing, phylogenetic analysis.

Введение

Применение технологии молекулярного скрининга для обнаружения новых вирусов в клиническом материале у пациентов с симптомами острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) позволило сотрудникам Каролинского института (Швеция) в 2005 г. открыть бокапарвовирус человека (HBoV1) [1], который, согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов, отнесли к семейству Parvoviridae, подсемейству Parvovirinae, роду Восарпарвовирус. Генетическое родство HBoV1 человека с двумя парвовирусами животных: бычьим парвовирусом (**bo**vine parvovirus) и парвовирусом собак (**ca**nine minute virus), являющимися основателями рода, а также выявление бокапарвовируса у свиней, горилл, шимпанзе и морских львов подтверждает гипотезу о том, что бокапарвовирус человека имеет зоонозное происхождение [2]. Использование технологии молекулярного скрининга также позволило в 2009 и 2010 гг. открыть новые генотипы бокапарвовируса человека: HBoV2, HBoV3 и HBoV4. В отличие от ранее описанного HBoV1, новые генотипы были выявлены в образцах фекалий человека с симптомами гастроэнтерита [3 – 5].

Вирионы HBoV1 представляют собой изометрические частицы с кубической симметрией диаметром 25 нм, лишённые липопротеиновой оболочки. Геном вируса содержит одноцепочечную линейную отрицательную молекулу ДНК длиной около 5300 п.н., которая кодирует неструктурные белки (NS1, NS2, NS3, NS4, NS70 и NP1) и 3 структурных полипептида VP1, VP2 и VP3. Структурные белки образованы путем альтернативного сплайсинга, с помощью которого вирус при наличии маленького генома увеличивает отдельные виды мРНК, которые транслируются в большое количество различных белков. Симметрично на концах генома вируса расположены инвертированные концевые повторы (Inverted Terminal Repeat, ITR) в размере 32 – 52 п.н., которые участвуют в репликации и интеграции ДНК вируса в геном клетки хозяина. Схематическое изображение генома бокапарвовируса человека представлено на рисунке 1 [2, 6].

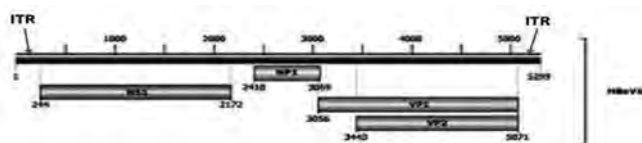


Рис. 1. Схематическое изображение генома бокапарвовируса человека [2]

Способность образовывать шпилечные структуры позволяет вирусу после перенесенного заболевания длительное время персистировать в организме хозяина. Геном вируса в зависимости от стадии инфекционного процесса может быть в трех формах: эписомы (кольцевая молекула) – латентная стадия инфекции, суперспирализованной молекулы – подготовка к репликации при наличии благоприятных условий, линейной молекулы ДНК при развитии клинических симптомов. Формы молекулы ДНК на разных стадиях бокапарвовирусной инфекции приведены на рисунке 2 [7, 8].

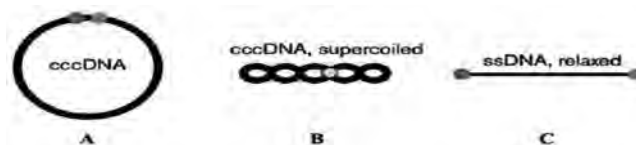


Рис. 2. Формы молекулы ДНК на разных стадиях бокапарвовирусной инфекции (А – кольцевая, В – суперспирализованная, С – линейная) [8]

С момента открытия HBoV1 опубликовано большое количество исследований и показана активная циркуляция возбудителя во всем мире. Однако, несмотря на имеющиеся данные о бокапарвовирусной инфекции, многие аспекты заболевания остаются недостаточно изученными. Частота выявления HBoV1 в различных исследованиях значительно варьирует и зависит от многих факторов: чувствительности метода диагностики, выборки пациентов, географического местоположения исследования и т.д. В настоящее время для выявления бокапарвовирусной инфекции используются молекулярные методы диагностики (полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование). Выявление вируса в клиническом материале на основе классических вирусологических методов (выделение вируса на культуре клеток) в настоящее время является затруднительным, так как отсутствует простая биологическая модель для культивирования вируса. Проведенные нами ранее исследования показали циркуляцию HBoV1 на территории нашей страны, однако из-за короткого периода наблюдений выявить молекулярно-эпидемиологические аспекты бокапарвовирусной инфекции не представлялось возможным [9, 10].

Цель исследования – изучить молекулярно-эпидемиологические аспекты бокапарвовирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь.

Материалы и методы

Исследования проводились в рамках дозорного надзора за гриппом и другими ОРВИ в со-

ответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» № 132 от 12.10.2010 г. в период с октября 2010 г. по октябрь 2018 г. Материалом для исследования служили назофарингиальные мазки (3907 мазка) от госпитализированных детей с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей в возрасте от 0 до 18 лет из всех административных районов страны. Мазки собирали в транспортную среду производства «АмплиСенс» (Российская Федерация) и хранили при температуре -20°C до проведения исследования, образцы парных сывороток крови (149 пар) были получены в острую фазу заболевания и в период выздоровления. Венозную кровь без антикоагулянтов отстаивали при комнатной температуре ($+15...+20^{\circ}\text{C}$) до полного образования сгустка. После образования сгустка сыворотку центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин на центрифуге Biosan LMC – 4200R (Латвийская Республика). После центрифугирования сыворотку собирали в стерильные пробирки и хранили при температуре -20°C до начала исследования.

Исследования образцов лимфоэпителиальной ткани аденоидов соматически здоровых пациентов в возрасте от 2 до 18 лет после проведения аденотомии (66 образцов) проводили в соответствии с нормативно-правовым регулированием биомедицинских исследований и клинической медицины в Республике Беларусь в период с октября 2015 г. по октябрь 2016 г. Ткань аденоидов помещали в стерильные пробирки, содержащие 2 мл транспортной среды следующего состава: раствор Хенкса, 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА), 4% раствор гентамицина сульфата (250 мг/л), нистатин ($0,5 \times 10^6$ МЕ/л). Из ткани аденоидов готовили 10% суспензию, которую использовали для выделения нуклеиновых кислот. Полученную суспензию хранили при температуре -20°C до проведения исследования. Доставка материала для исследований осуществлялась с соблюдением холодовой цепи в соответствии с инструкцией «Комплексная диагностика гриппа» № 121-1210 от 18.01.2011 г. Каждый образец сопровождался направлением, содержащим паспортные данные пациента, дату заболевания и забора материала, клинический диагноз. Клинический материал тестировали на наличие генетического материала следующих респираторных вирусов: гриппа типа А и типа В, парагриппа 1 – 4 типа (ПГ), респираторно-синцитиального вируса (РС), метапневмовируса (МПВ), риновируса (РВ), аденовируса (АД), коронавируса (КВ) и бокапарвовируса человека (БВ).

Выявление генетического материала респираторных вирусов проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene 6000

(Corbett research, Австралия) с использованием диагностических наборов «Influenza virus A/B-FL», «ОРВИ-скрин» производства «АмплиСенс» (Российская Федерация), «ФЛУ-ген», «ОРВИ-ген» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь). Выделение ДНК и РНК респираторных вирусов проводили с коммерческим набором «Рибо-сорб» производства «АмплиСенс» (Российская Федерация) и отечественным набором «НуклеСорб» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» производства «АмплиСенс», (Российская Федерация), «РЕВЕРТАЗА – M-MuLV-50» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь). Все исследования выполняли согласно инструкции производителя к данным наборам.

Секвенирование ДНК бокапарвовируса проводили из клинического материала пациентов с тяжелым течением ОРВИ с использованием коммерческого набора «Genome Lab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США). Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Beckman Coulter «SEQ 8000» (Beckman Coulter, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей основывалось на алгоритме Clustal W, встроенного в программу MEGA 6.0. Для построения филогенетических деревьев использовали метод максимального правдоподобия (ML) (Tamura K, 2007). Выбор модели построения филогенетического дерева основывали на самом низком байесовском значении информационного критерия (BIC). Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были исключены из анализа. Для моделирования эволюционных разностей скоростей между сайтами использовалось дискретное распределение Гамма, значения которого варьировали в зависимости от анализируемых последовательностей. Оценка достоверности реконструированной топологии филогенетических деревьев проводилась с помощью бутстреп-анализа (1000 репликаций) (Fleckenstein, 2004). В статье использовали международный код аминокислот: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, F – фенилаланин, G – глицин, H – гистидин, I – изолейцин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, N – аспарагин, P – пролин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, W – триптофан, Y – тирозин.

Статистический анализ результатов проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Определяли следующие величины: процентное выражение ряда данных. Определение частоты проявления качественных признаков основыва-

лось на сравнении эмпирических распределений с помощью критерия χ^2 . Различия считались достоверными при $p < 0,05$, высоко достоверными — при $p < 0,001$, недостоверными — при $p > 0,05$.

Результаты и обсуждение

В рамках исследования (2010–2018 гг.) проанализировано 3907 назофарингеальных мазка. Генетический материал респираторных вирусов выявлен в 2781 случае (71,2%). В этиологической структуре всех верифицированных ОРВИ у госпитализированных детей преобладали негриппозные вирусы. Этиологическая структура ОРВИ за данный период исследований приведена на рисунке 3.

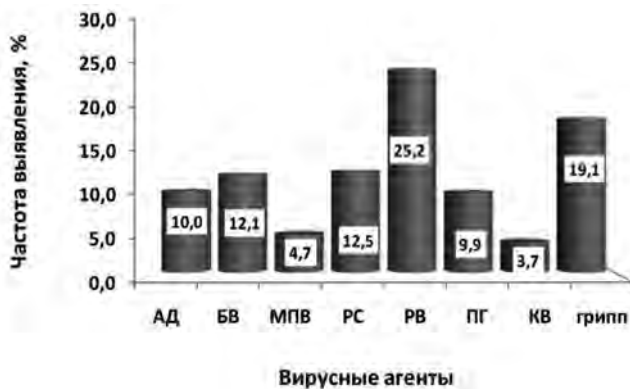


Рис. 3. Этиологическая структура ОРВИ за период 2010–2018 гг.

Ведущим инфекционным агентом стал риновирус, который был выявлен у 701 ребенка (25,2%). Следующим по частоте встречаемости в структуре ОРВИ являлся вирус гриппа — 532 (19,1%) пациента. Генетический материал других вирусов (РС-вируса, парагриппа 1–4 типа, аденовируса, метапневмовируса и коронавируса) детектировали у 347 (12,5%), 275 (9,9%), 278 (10,0%), 130 (4,7%) и 102 (3,7%) детей соответственно. Бокапарвовирус как этиологический агент острого респираторного заболевания обнаружен у 337 (12,1%) пациентов. НВов1 стал четвертым вирусом по частоте встречаемости, наряду с другими респираторными вирусами ($p < 0,05$).

Частота встречаемости НВов1 в этиологической структуре положительных образцов в зависимости от эпидемического сезона варьировала в пределах от 6,7% до 19,4%. Наиболее высокий уровень бокапарвовирусной инфекции зарегистрирован в сезон 2011–2012 гг. — 19,4%, самый низкий (6,7%) отмечен в 2013–2014 гг. За анализируемый период прослеживается четкая тенденция циклического течения эпидемического процесса при бокапарвовирусной инфекции с наличием периодов с высокими и низкими показателями заболеваемости. Частота выявления бокапарвовируса в этиологической структуре ОРВИ в период 2010–2018 гг. представлена на рисунке 4.

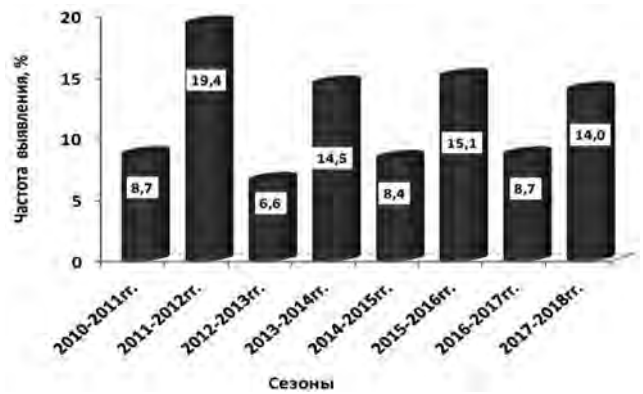


Рис. 4. Частота выявления бокапарвовируса в период 2010–2018 гг.

При анализе внутригодовой динамики бокапарвовирусной инфекции отмечен подъем заболеваемости в осенний период. Максимальная частота выявления НВов1 наблюдалась в ноябре. В мазках, забранных в период с января по май, а также в летний период, генетический материал бокапарвовируса выявлялся в виде спорадических случаев. Однако в Витебской, Могилевской и Минской областях пик активности вируса регистрировался в октябре (рис. 5).

В ходе исследования была определена возрастная группа риска по заболеваемости НВов1. Наиболее восприимчивыми к данной инфекции являются дети в возрасте с 2 до 4 лет. Из всех положительных находок 60,4% относились именно к данной возрастной категории. Отмечено снижение выявления ДНК бокапарвовируса в назофарингеальных мазках, полученных от детей возрастной группы 5–7 и 8–18 лет (рис. 6).

Для изучения диапазона нозологических проявлений бокапарвовирусной инфекции проведен анализ направлений, сопровождающих каждый клинический образец. При изучении нозологического спектра установлено, что бокапарвовирусная инфекция характеризуется поражением как верхних, так и нижних дыхательных путей. По результатам наших исследований, практически во всех нозологических формах НВов1 чаще выявлялся в виде моноинфекции с преимущественным поражением нижних дыхательных путей и развитием клинической картины острого бронхита (32,2%) либо пневмонии (19,7%) ($p < 0,05$, критерий χ^2). Разнообразие нозологических форм при бокапарвовирусной инфекции представлено на рисунке 7.

В клинической практике одним из критериев тяжести респираторного заболевания являются процессы, вызванные циркуляцией вируса в крови (виремия). При развитии виремии усиливаются явления общего токсикоза и тяжесть состояния

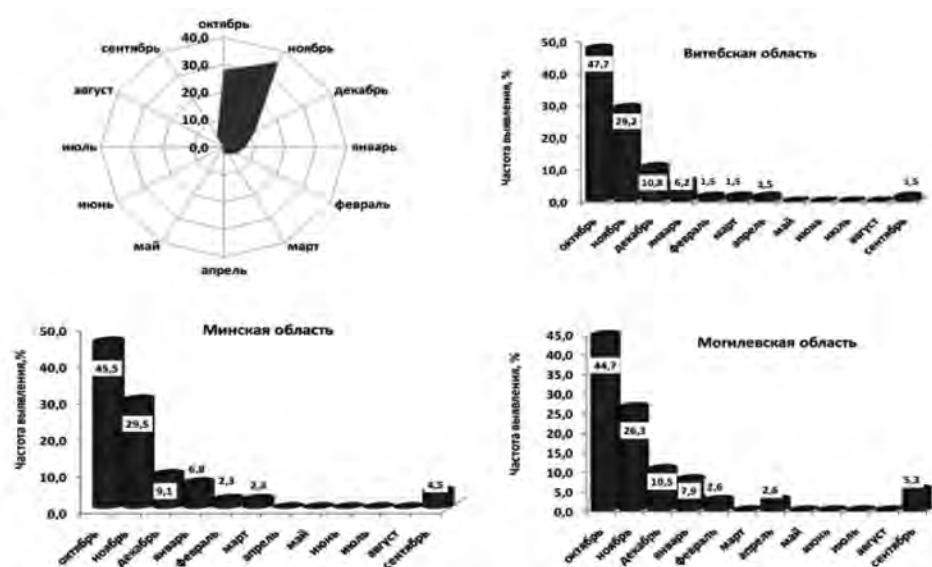


Рис. 5. Внутригодовая динамика бокапарвовирусной инфекции в период 2010 – 2018 гг.

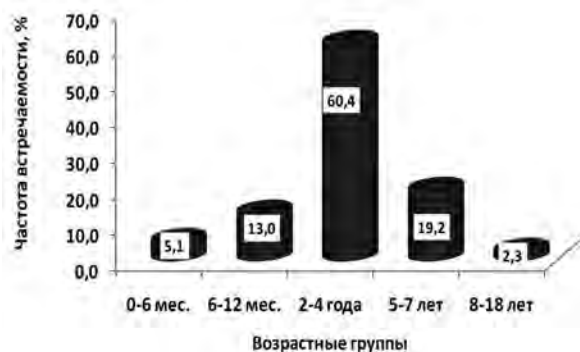


Рис. 6. Частота выявления бокапарвовируса в разных возрастных группах

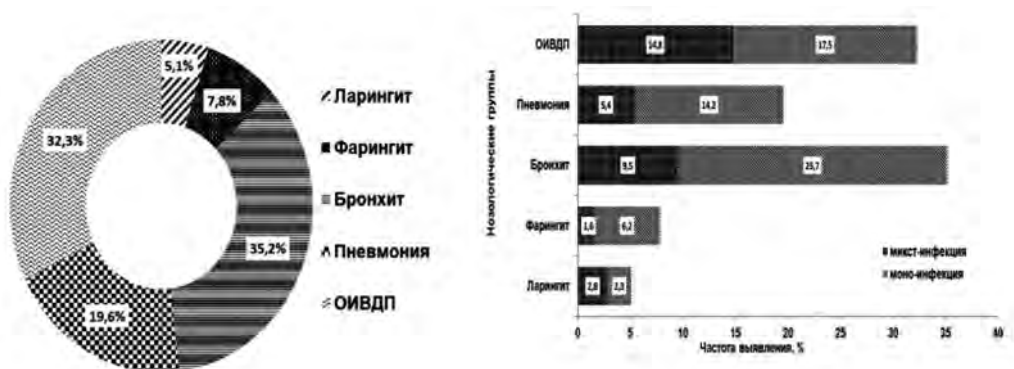


Рис. 7. Разнообразие нозологических форм бокапарвовирусной инфекции у госпитализированных детей

пациента. Для изучения частоты развития вирусемии при бокапарвовирусной инфекции исследованы 148 образцов парных сывороток крови пациентов, у которых в назофарингеальных мазках был выявлен генетический материал НВов1. В сыворотках, полученных в острую фазу заболевания (первые три дня от начала заболевания), наличие

генетического материала бокапарвовируса было выявлено в 81 (54,7%) образце, ДНК бокапарвовируса в образцах сыворотки крови на стадии выздоровления выявлена у 40 (27%) пациентов. Длительность вирусемии у данных пациентов варьировала от 6 до 15 дней. Как показали результаты исследования, НВов1 может активно циркулировать в пери-

ферической крови в течение длительного времени, что не исключает возможности последующей его персистенции в организме. В литературе описаны случаи присутствия НВов1 в респираторном тракте и выявления его при повторной госпитализации в течение 1–6 месяцев [8]. В наших исследованиях мы показали, что наиболее восприимчивыми к данной инфекции являются дети возрастной категории от 2 до 4 лет, высокая частота развития вирусии отмечена также в данной возрастной группе и составила 68,3% (рис. 8).

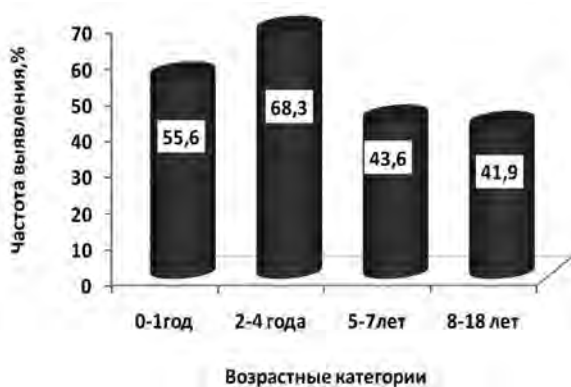


Рис. 8. Частота выявления НВов1 в сыворотках

Среди госпитализированных детей, в сыворотке которых выявлена ДНК вируса, 49 (60,5%) пациентов проходили лечение в отделении интенсивной терапии и реанимации (ОИТР) с клиническим диагнозом «Пневмония», в 2 случаях заболевание осложнилось развитием плеврита. Клинические проявления обструктивного бронхита с выраженным синдромом интоксикации и дыхательных расстройств наблюдались у 19 (23,4%) человек, с развитием тяжелой острой респираторной инфекцией в ОИТР лечение проходили 13 человек (16%) ($p < 0,05$, критерий χ^2).

Входными воротами для возбудителей ОРВИ являются верхние дыхательные пути, где респираторные вирусные антигены впервые вступают в контакт с защитными клетками человека, расположенными в таких лимфоэпителиальных органах, как аденоиды и небные миндалины. Выделение аденовируса и герпес-вируса из миндалин и аденоидов было описано в 1950-х гг. и 1960-х гг. [11, 12], однако появление чувствительных молекулярных методов позволило обнаружить многие другие вирусы в аденоидах и небных миндалинах. По данным литературы, бокапарвовирусы других видов имеют тропность к лимфоэпителиальной ткани верхних дыхательных путей и могут сохраняться в ней достаточно длительное время, приводя к хроническому воспалению этих тканей. Чтобы из-

учить частоту выявления НВов1 в лимфоэпителиальной ткани аденоидов у соматически здоровых детей, нами проанализировано 66 образцов лимфоэпителиальной ткани аденоидов, полученной после проведения аденотомии. В 39 из 66 образцов ткани (59,1%) выявлен генетический материал респираторных вирусов. Частота выявления респираторных вирусов в лимфоэпителиальной ткани аденоидов представлена на рисунке 9.

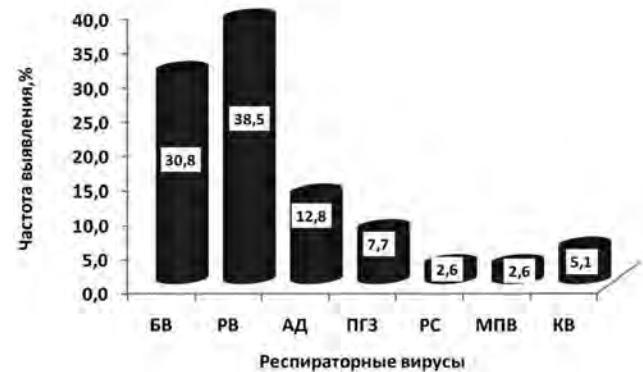


Рис. 9. Частота выявления респираторных вирусов в лимфоэпителиальной ткани аденоидов

По результатам наших исследований, в 38,5% случаев в лимфоидной ткани аденоидов выявлялся генетический материал риновируса, вторым по частоте выявления стал бокапарвовирус (30,8%). ДНК аденовируса выявлена в 12,8% образцов, РНК вируса парагриппа – в 7,7%. Респираторно-синцициальный вирус, метапневмовирус и коронавирус были выявлены в единичных образцах с частотой 2,6%, 2,6% и 5,1% соответственно. Образцы ткани аденоидов, в которых был выявлен НВов1, были получены от пациентов возрастной категории 3–7 лет. Таким образом, наличие генетического материала в лимфоидной ткани респираторных вирусов у соматически здоровых детей позволяет предположить участие респираторных вирусов, в том числе и бокапарвовируса, в развитии гиперплазии лимфоидного глоточного кольца у детей раннего и дошкольного возраста, а также в развитии повторных реинфекций при снижении иммунного статуса пациентов.

Для выявления универсальных аминокислотных замен в геноме бокапарвовирусов, выявленных на территории страны, проведен анализ нуклеотидных последовательностей полного генома четырех бокапарвовирусов, от пациентов с обструктивным бронхитом (НВов1BLR/Minsk/10/14, НВов1BLR/Minsk/11/14) и тяжелым течением ОРВИ (НВов1BLR/Mogilev/241/14,

НВoV1BLR/Gomel/285/15). Полученные нуклеотидные последовательности белорусских бокапарвовирусов депонированы в Международную базу данных NCBI и имеют следующие коды доступа: MF376167, MF376168, MF376169, MF376170.

Филогенетический анализ показал, что вирусы, выявленные на территории страны, принадлежат к генотипу НВoV1. Гомология последовательностей белорусских бокапарвовирусов с референс-штаммом ST2 составила для НВoV1BLR/Minsk/10/14, НВoV1BLR/Mogilev/241/14, НВoV1BLR/Gomel/285/15 – 99,8%, для НВoV1BLR/Minsk/11/14 – 99,74%. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой консервативности среди бокапарвовирусов генотипа НВoV1, несмотря на географическую удаленность изолятов. Согласно данным филогенетического анализа, 3 белорусских ви-

руса НВoV1BLR/Mogilev/241/14, НВoV1BLR/Minsk/10/14, НВoV1BLR/Minsk/11/14 образовывали отдельную группу и показали генетическое родство с референс-вирусом ST2 (Швеция, 2005). НВoV1 BLR/Gomel/285/15 выявил генетическое родство с референс вирусом ST2, а также с НВoV1, выделенным в Египте (KU557404, 2017).

Анализ первичной структуры генома белорусских бокапарвовирусов показал наличие уникальных аминокислотных замен. Особый интерес представили несинонимичные замены, которые привели к замене аминокислот как в структурных, так и в неструктурных белках вирусов.

Филограмма на основе анализа полного генома белорусских бокапарвовирусов, референс-штаммов и бокапарвовирусов из других стран мира изображена на рисунке 10.

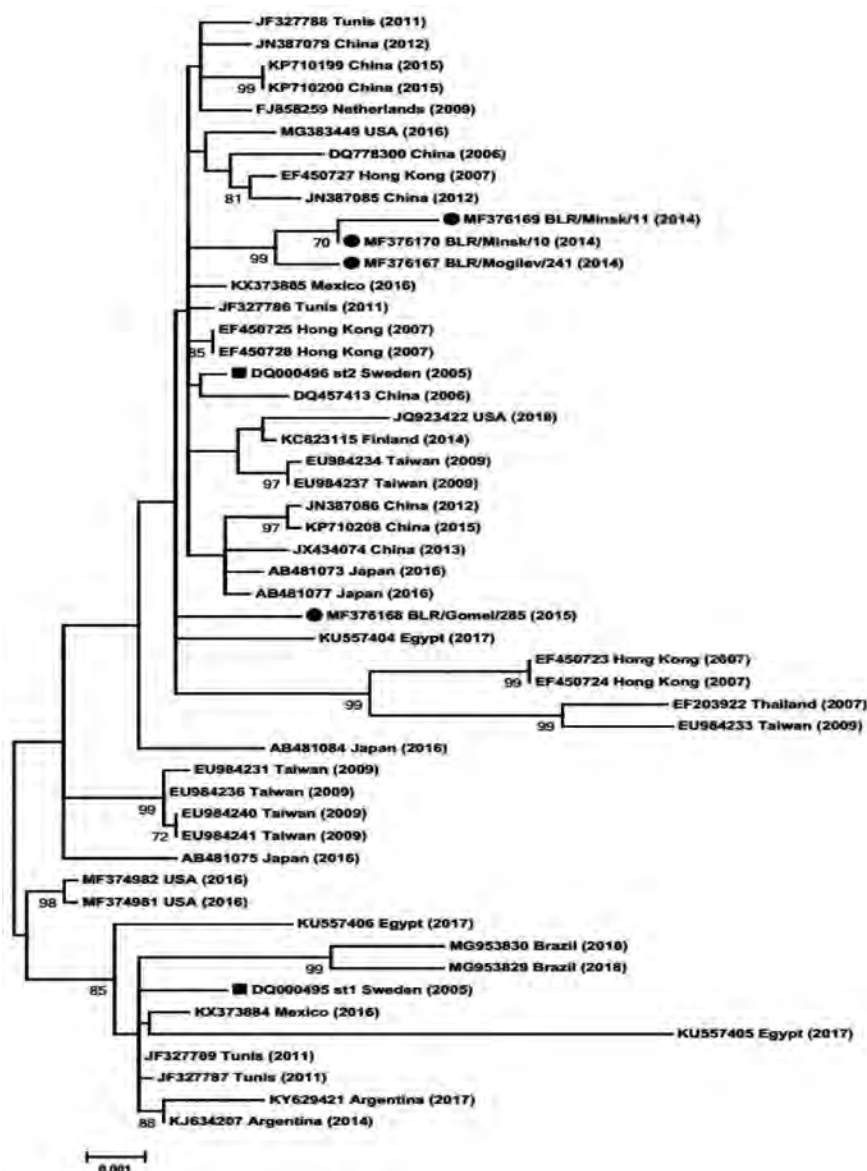


Рис. 10. Филограмма полного генома бокапарвовирусов (● – белорусские вирусы, ■ – референс-вирусы)

Неструктурный белок NS1 является многофункциональным белком, который проявляет эндонуклеазную и геликазную активность, необходимую для инициации и направления репликации вирусной ДНК, играет роль в вирусной упаковке и трансактивации нескольких промоторов. Анализ первичной структуры белка NS1 белорусских бокапарвовирусов показал следующие аминокислотные замены: HBoV1BLR/Minsk/10/14 (P157S, N184T, F208L, C420G, Q438P, W465G, D598E), HBoV1BLR/Minsk/11/14 (P157S, C420G, Q438P, W465G, D598E), HBoV1BLR/Mogilev/241/14 (P157S, N184T, F208L), HBoV1BLR/Gomel/285/15 (P157S). Анализ локализации аминокислотных замен у изучаемых возбудителей показал, что 6 из 7 аминокислотных замен в белке NS1 располагались в области сайт-специфических доменов, отвечающих за эндонуклеазную и геликазную активность, и располагались в следующих позициях: P157S, N184T, F208L, C420G, Q438P, W465G. Замена аспарагиновой кислоты на глютаминовую кислоту в положении 598 белка NS1 вирусов HBoV1 BLR/Minsk/11/14 и HBoV1 BLR/Minsk/10/14 была локализована в С-терминальной части белка NS1, которая является трансактиваторным доменом и отвечает за функционирование неструктурного белка NP1 [13].

Наличие неструктурного протеина NP1 отличает представителей рода *Vocarpovovirus* от других представителей подсемейства *Parvovirinae*. Неструктурный белок NP1 играет важную роль в экспрессии мРНК, кодирующей структурные белки VP1/VP2/VP3. Анализ первичной структуры белка NP1 белорусских бокапарвовирусов показал наличие следующих аминокислотных замен: HBoV1 BLR/Minsk/10/14 (V152T), HBoV1 BLR/Mogilev/241/14 – (E79K, V152T), HBoV1 BLR/Gomel/285/15- (T136A), HBoV1 BLR/Minsk/11/14 – (V152T).

Структурный протеин VP1 представителей рода *Vocarpovovirus* играет важную роль в репликации вируса в ядре клетки и участвует в эндосомальном выходе новых вирионов. Структурный белок VP2 имеет высококонсервативные элементы вторичной структуры, которые используются для типирования между родами парвовирусов, а также варибельные поверхностные петли, которые отвечают за специфический тропизм к клеткам хозяина и формирование антигенных свойств, белок VP3 участвует в сборке капсида вируса. Выявленные в ходе филогенетического анализа замены в нуклеотидных последовательностях структурных белков VP1/VP2/VP3 привели к следующим аминокислотным заменам: HBoV1BLR/Minsk/10/14 – (K189R, Y244H), HBoV1BLR/Minsk/11/14 – (Y244H, Q416E, R439K), HBoV1BLR/Mogilev/241/14 – (K189R, Y244H,

I643R,) HBoV1BLR/Gomel/285/15 – (P295S, K591E, C628S, T629S, R630G).

Заключение

Проведенное исследование показало, что HBoV1 играет важную роль в этиологии ОРВИ у детей, особенно в раннем детском возрасте от 2 до 4 лет. За данный период наблюдений показана активная циркуляция бокапарвовируса в осенний период и в виде спорадических случаев в весеннее, зимнее и летнее время на всей территории республики. Заболевание, ассоциированное с HBoV1, может иметь разнообразные клинические проявления с преимущественным поражением нижних дыхательных путей и протекать как в легкой, так и в тяжелой форме. При генерализации процесса и появлении виремии бокапарвовирусная инфекция имеет тяжелое течение и для лечения требуется госпитализация. Выявление ДНК HBoV1 в лимфоэпителиальной ткани аденоидов показывает возможность персистенции вируса в организме длительное время после перенесенного заболевания. Выявленные нами замены в геноме HBoV1 были локализованы в функционально значимых участках генома. Возможно, данные аминокислотные замены могут влиять на вирулентность вируса, а также на спектр рецепторных взаимодействий и тропизм вируса, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *P Natl Acad Sci* 2005 Jun; 102:12891 – 6.
2. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol* 2016 Oct; 22(39):8684-8697.
3. Kapoor A, Mehta N, Esper F, et al. Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS ONE* 2010 July; 5(7): E11948.
4. Cheung AK, Wu G, Wang D, Bayles DO, Lager KM, Vincent AL. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Arch Virol.* 2010 March; 155(5):801 – 806.
5. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog* 2009 Apr; 5(4):1-11.
6. Qiu J, Söderlund – Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. *Clin Microbiol* 2016 Nov; 30:43 – 113.
7. Kapoor A, Hornig M, Asokan A et al. Bocavirus episome in infected human tissue contains non – identical termini. *PLoS ONE* 2011 Jun; 6: e21362.
8. Windisch W, Pieper M, et al. Latent infection of human Bocavirus accompanied by flare of chronic cough, fatigue and episodes of viral replication in an immunocompetent adult patient. *JMM* 2016 Aug; 3(4): e005052.
9. Шмелева, Н.П. Этиология ОРИ у детей на современном этапе / Н.П. Шмелева, Н.В. Сивец, Е.Н. Сергеев // *Мед. журн.* – 2011. – № 4. – С. 129–131.
10. Сивец, Н.В. Ассоциация респираторной патологии с бокавирусом человека / Н.В. Сивец, Н.П. Шмелева, Н.В.

Грибкова // Современные проблемы инфекционной патологии человека // Сб науч. тр. Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии / редкол. Г.М. Игнатъев (гл. ред.) [и др.]. — Минск, 2011. — С. 34–37.

11. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1954 Jan 84: 570–573.

12. Szalaty H, Dubowska-Inglot A. Isolation and typing of adenoviruses from adenoids. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1959. 7: 615–623.

References

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. P Natl Acad Sci 2005 Jun; 102:12891–6.

2. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. World J Gastroenterol 2016 Oct; 22(39):8684-8697.

3. Kapoor A, Mehta N, Esper F, et al. Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. PLoS ONE 2010 July; 5(7): E11948.

4. Cheung AK, Wu G, Wang D, Bayles DO, Lager KM, Vincent AL. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. Arch Virol. 2010 March; 155(5):801–806.

5. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. PLoS Pathog 2009 Apr; 5(4):1-11.

6. Qiu J, Söderlund – Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. Clin Microbiol 2016 Nov; 30:43–113.

7. Kapoor A, Hornig M, Asokan A et al. Bocavirus episome in infected human tissue contains non – identical termini. PLoS ONE 2011 Jun; 6: e21362.

8. Windisch W, Pieper M, et al. Latent infection of human Bocavirus accompanied by flare of chronic cough, fatigue and episodes of viral replication in an immunocompetent adult patient. JMM 2016 Aug; 3(4): e005052.

9. Shmeleva N.P. Medicinskij zhurna. 2011. 4: 129 – 131 (in Russian).

10. Sivec N.V. Asociacija respiratornoj patologii s bokavirusom cheloveka / Sivec N.V., Shmeleva N.P., Gribkova N.V. [Association children’s respiratory pathology with human bocavirus] in Sbornik nauchnyh trudov Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka [Modern problems of human infectious pathology]. Minsk; 2011. P 34-37. (in Russian).

11. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1954 Jan 84: 570–573.

12. Szalaty H, Dubowska-Inglot A. Isolation and typing of adenoviruses from adenoids. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1959. 7: 615–623.

Авторский коллектив:

Сивец Наталья Валерьевна — научный сотрудник лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии; e-mail: sivets_n@mail.ru

Шмелева Наталья Петровна — заведующая лабораторией гриппа и гриппоподобных заболеваний Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии; e-mail: shmelevanataliya@mail.ru

Лапо Татьяна Петровна — младший научный сотрудник лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии; e-mail: tatyanalapo@gmail.com