

На правах рукописи

Прилипов Алексей Геннадьевич

Генетическая характеристика штаммов вируса Западного Нила

03.01.03 – Молекулярная биология

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 2016 г.

Работа выполнена в НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Львов Дмитрий Константинович

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович, доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение «48 Центр научных исследований» Министерства обороны РФ, начальник

Мирошников Константин Анатольевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии.

Летаров Андрей Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, руководитель лаборатории вирусов микроорганизмов.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П. Чумакова» РАН.

Защита диссертации состоится ____ апреля 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.bio.msu.ru.

Автореферат разослан ____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Арбовирусы – это экологическая группа вирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, москитов, мошек и мокрецов. Такие арбовирусные инфекции, как лихорадка денге, жёлтая лихорадка, энцефалиты – японский, клещевой, Сент-Луис, лихорадка Западного Нила, и другие – далеко не полный перечень опасных для человека арбовирусных инфекций, представляющих огромное значение для здравоохранения в эндемичных регионах мира.

Вирус Западного Нила приобрел особую значимость после ряда крупных эпидемических вспышек, произошедших в конце 1990-х годов в различных частях света и характеризующихся необычно частыми, для данной инфекции, случаями поражения ЦНС и высокой смертностью. В 1994 году произошла вспышка в Алжире, в ходе которой было зарегистрировано около 50 случаев заболевания с 8 летальными исходами. Последующая вспышка ЛЗН была зарегистрирована в Румынии в 1996 году, где также наблюдался необычно высокий (~9%) уровень смертности. В 1997 году на гусиных фермах в Израиле случилась крупная эпизоотия ЛЗН с острыми неврологическими проявлениями. Среди людей эпидемия случилась в 2000 году, хотя еще в 1999 году было отмечено два смертельных случая заболевания ЛЗН. В общей сложности в 2000 году в Израиле было зарегистрировано 417 подтвержденных случаев заболевания ЛЗН, причем в половине случаев с поражениями ЦНС. Уровень смертности при этом составлял, по разным данным, от 8 до 14 %. В 1999 году почти одновременно эпидемические вспышки ЛЗН произошли на юге России и в Нью-Йорке, США, при сходном (~ 10%) уровне летальности.

Вопрос, чем обусловлено серьезное изменение характера патогенности эпидемических вспышек, вызванных в последнее время вируса Западного Нила, остается открытым. Сравнительный и эволюционный анализ первичной структуры геномов различных изолятов ВЗН, поиск и изучение генетических

детерминант вируса, отвечающих за его патогенные свойства, являются в настоящее время предметом интенсивных исследований.

Степень разработанности темы исследования

В работе научно обоснованы и практически реализованы результаты исследований, которые создают базу для дальнейшего изучения ВЗН. Созданы системы для проведения исследований по выявлению РНК ВЗН в пробах комаров и клещей, оптимизированы подходы по определению полных последовательностей генома для ВЗН различных генотипов, проанализирован состав штаммов ВЗН, распространенных как на территории РФ, так и в мире. Внесен существенный вклад в понимание вариабельности штаммов ВЗН и филогенетические взаимоотношения различных генотипов вируса. Решены некоторые фундаментальные и прикладные вопросы, имеющие важное значение для охраны здоровья населения страны.

Цель исследования

Характеристика, изучение генетических свойств и анализ детерминант патогенности штаммов ВЗН, циркулирующих на эндемичной территории юга России, а также исторических штаммов, находящихся в Государственной коллекции института вирусологии им. Д.И.Ивановского.

Для выполнения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. Установить первичную структуру геномов 9 исторических штаммов вируса Западного Нила из Государственной коллекции вирусов института вирусологии им. Д.И.Ивановского.
2. Установить первичную структуру геномов 22 штаммов вируса Западного Нила, изолированных в 1999-2005 гг. на территории Астраханской и Волгоградской областей.
3. Определить принадлежность исследуемых штаммов ВЗН к известным генотипам этого вируса, а в случае выявления вирусов, не принадлежащих к уже известным генотипам, охарактеризовать новые генотипы и предложить среди исследованных штаммов топотипные варианты ВЗН.

4. Разработать оптимальную схему для определения полной первичной структуры генома для вирусов ВЗН субгенотипа 1a.
5. Создать тест-систему на основе ОТ-ПЦР, позволяющую проводить идентификацию РНК ВЗН в пробах членистоногих переносчиков.
6. Охарактеризовать генетические свойства вирусной популяции, циркулировавшей на территории Астраханской области в 2001-2005 гг.
7. Разработать экспериментальную систему для изучения биологических свойств ВЗН методом обратной генетики на основе низкопатогенного штамма.

Научная новизна

В данной работе впервые была определена полная нуклеотидная последовательность генома для 31 штамма ВЗН, в том числе для 24 штаммов, изолированных в России. Это составляет до настоящего времени 45% данных для Евразии и более 82% данных для России. Впервые, на основании полной последовательности генома вируса была показана принадлежность индийского штамма Ig2266 к новому генотипу 5, что в дальнейшем было подтверждено работами исследователей из Индии. Впервые, была показана принадлежность и штамма Kгnd88-190 к новому генотипу 4, не известному до настоящей работы, что также было подтверждено позднее работами других исследователей.

Впервые была получена молекулярно-генетическая характеристика данных штаммов, включающая в себя анализ их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, а также поиск известных функциональных детерминант вируса, отвечающих за его патогенные свойства.

В данной работе были предложены оптимизированные стратегии работы для получения полных последовательностей генома для ВЗН субгенотипа 1a, проведен анализ использования большого количества олигонуклеотидных праймеров с точки зрения их эффективности для проведения ПЦР и секвенирования.

Клонирована кДНК копия полного генома вируса Западного Нила, относящегося к IV генотипу на основе низкопатогенного штамма LEIV-Krnd88-190. Создана экспериментальная система для получения вирусной РНК *in vitro*.

Практическое значение

Разработана система ОТ-ПЦР для детекции РНК ВЗН в пробах полевого материала и продемонстрирована её эффективность и специфичность при работе с пулами комаров и клещей. Проанализирован генотипический состав ВЗН из членистоногих переносчиков в Астраханской области в 2001-2005 гг. Проанализирован процентный состав зараженности для различных видов комаров в Астраханской области в 2001-2005 гг.

Клонирована кДНК копия полного генома вируса Западного Нила, относящегося к IV генотипу на основе низкопатогенного штамма LEIV-Krnd88-190. Создана экспериментальная система для получения вирусной РНК *in vitro*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлена полная нуклеотидная последовательность геномов 31 штамма ВЗН. Для 28 штаммов ВЗН показана принадлежность к субгенотипу 1a и для одного штамма к генотипу 2.
2. На основании сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей геномов штамм вируса Krnd88-190 предложено отнести к новому генотипу 4.
3. На основании сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей геномов штамм вируса Ig2266 предложено отнести к новому генотипу 5.
4. Проведена молекулярно-генетическая характеристика данных штаммов, включающая в себя анализ их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, а также поиск известных функциональных детерминант вируса, отвечающих за его патогенные свойства.

5. Создана ОТ-ПЦР тест система для определения РНК ВЗН, данная система показала высокую специфичность и чувствительность при работе с пробами пулов комаров и клещей.

6. Создана экспериментальная система для транскрипции вирусной РНК *in vitro* на основе бактериальной высококопийной плазмиды, несущей полноразмерную кДНК копию вирусного генома.

Личный вклад соискателя

Основные результаты диссертационной работы получены лично. Некоторые разделы выполнены при участии сотрудников лаборатории молекулярной генетики ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского".

Внедрение результатов исследований в практику

Разработанная тест – система для детекции РНК ВЗН защищена патентом РФ №2199589 от 27.02.2003 г.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась на заседании Совета по предварительной экспертизе диссертационных работ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» Министерства здравоохранения РФ 17 июня 2015 г.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы отражены в печати, в том числе, в 14 статьях в отечественных рецензируемых журналах, входящих в Перечень, рекомендованный ВАК, и в двух публикациях в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографические базы - Web of Science, Scopus, PubMed). Материалы диссертации были так же представлены в виде тезисов на конференциях, в том числе 6 международных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 202 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка литературы, содержащего 366 источников, иллюстрирована 23 таблицами, 47 рисунками.

Результаты собственных исследований

1. Определение и анализ первичной структуры генома штаммов ВЗН, изолированных до 2001 г

К моменту начала работ по определению первичной нуклеотидной последовательности геномов ВЗН в 2000 г. в распоряжении исследователей находилось крайне малое количество последовательностей, депонированных в базы данных. Фактически, был доступен один геном ВЗН генотипа 2 (WN-Wengler (GenBank #M12294)), один геном вируса Кунджин (MRM61C (GenBank #D00246)), который в то время считался отдельным вирусом, родственным ВЗН и, несколько позже в 2000 г. стал доступен первый геном ВЗН генотипа 1а, изолированный во время эпидемической вспышки в 1999 г. в Нью-Йорке (HNY-99 (GenBank #AF260869)). Основное количество доступных на это время последовательностей штаммов ВЗН, в большинстве своем представляли вариабельный участок гена Е, имели длину 200-240 н.о., использовались для построения филогенетических деревьев и определения родства между штаммами ВЗН и, как наиболее вариабельные участки генома вируса, были непригодны для подбора универсальных праймеров, локализованных в консервативных областях и способных амплифицировать в полимеразной цепной реакции весьма различные по первичной последовательности геномы ВЗН, принадлежащие к вирусам разных генотипов.

Разделение ВЗН на генотипы, принятое в 2000 г., и основанное на сравнении вариабельного участка гена Е длиной 223 н.о. предполагало наличие двух генотипов ВЗН: к первому генотипу относились штаммы

близкие к изолированному в Нью-Йорке (современный генотип 1a), ко второму – штаммы близкие к оригинальному штамму, изолированному в 1936 г. в Уганде (современный генотип 2). К этому времени была известна последовательность этого участка генома для генотипа из Индии (современный генотип 5), но из-за небольшой протяженности и вызванных этим артефактов при анализе, изолят из Индии был отнесен к генотипу 1. Вирус Кунджин рассматривался как отдельный вирус, хотя и родственный ВЗН (современный генотип 1b).

1.1. Определение и анализ первичной структуры генома штаммов ВЗН от 5'-конца до праймера 3594Runi

Для всех исследуемых штаммов ВЗН был проведен филогенетический анализ на основе достаточно протяженного участка от 5'-конца до праймера 3594Runi с целью уточнить их принадлежность к различным известным генотипам ВЗН и прояснить положение индийского штамма Ig2266.

На этом этапе работы появилась возможность проанализировать гомологию участка гена Е между определенной последовательностью штамма Ig2266 и опубликованной частичной последовательностью индийских изолятов. Анализ показал практически полную идентичность последовательностей на этом небольшом участке и, что указывало на то, что штамм Ig2266, выделенный в Индии, принадлежит к этой группе. Одновременно, филогенетический анализ, проведенный не на маленьком вариабельном участке гена Е, а на первой трети генома (3500 н.о.), показывал его принадлежность не к генотипу 1, а к своему, отдельному от других генотипу (в настоящее время генотип 5). Это было необходимо для определения стратегии подбора праймеров: либо подбирать универсальные праймеры для генотипа 1 и штамма Ig2266, либо, при серьезных отличиях нуклеотидных последовательностей, для штамма Ig2266 выбирать отдельно, без сравнения с последовательностями 1-го генотипа. На рис. 1 показана радиальная филограмма нуклеотидных последовательностей штаммов вируса Западного Нила с начала открытой рамки считывания до позиции 3450

нуклеотида. Видно, что исследуемые штаммы представляют четыре генотипа: основная масса – генотип 1, штамм 3266 – генотип 2, штаммы Ig2266 и Tyr-2914 – индийский генотип 5, штамм Krsn88-190 – новый, неизвестный генотип 4.

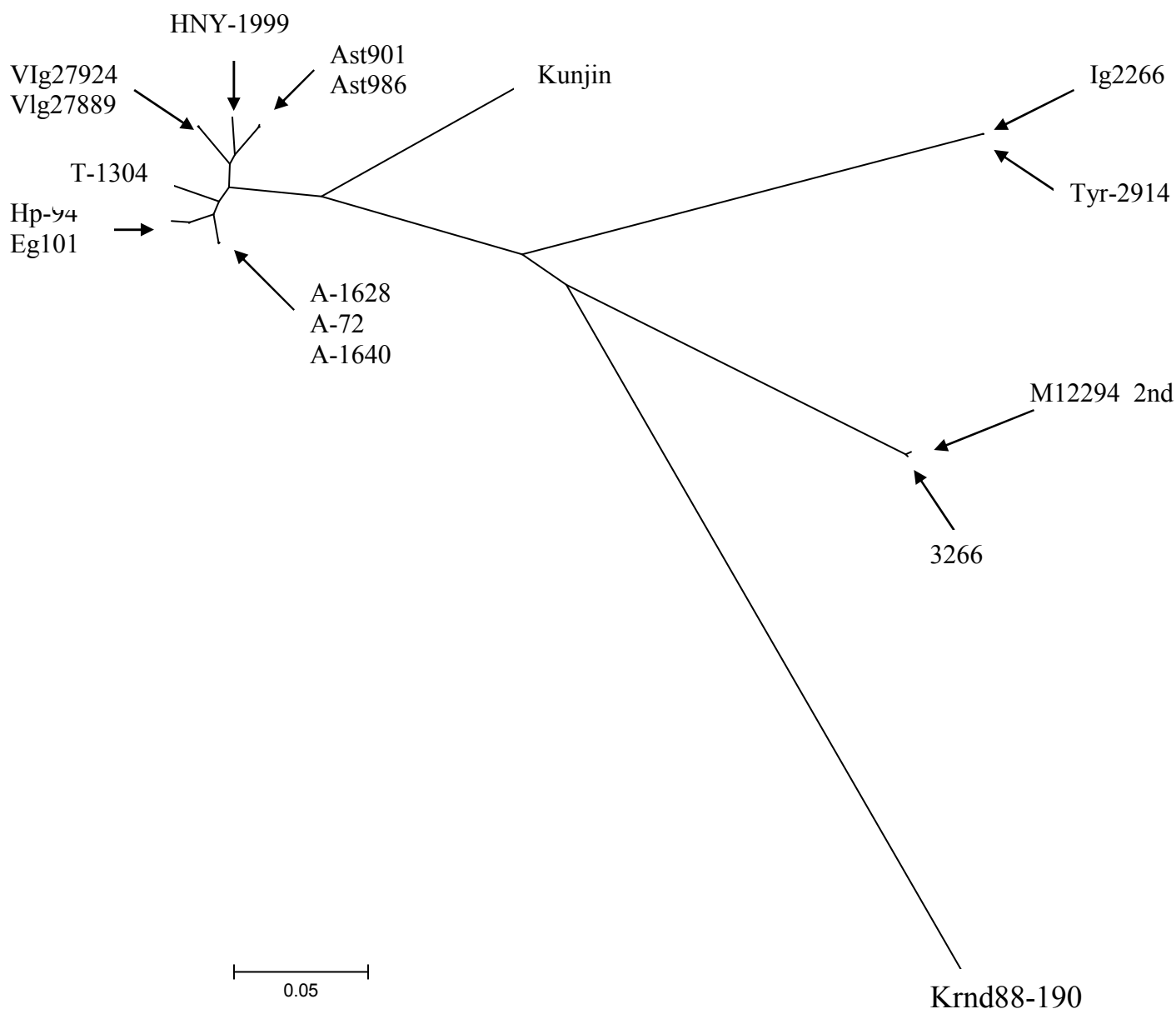


Рис.1 Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения участков длиной 3,5 т.п.н. 5'-концевой части генома.

1.2. Определение и анализ первичной структуры генома штаммов ВЗН генотипа 1

Основной задачей по оптимизации определения первичных последовательностей геномов ВЗН генотипа 1 была разработка такого набора олигонуклеотидных праймеров, который не только бы позволил решить с наименьшими затратами задачу по исследованию штаммов, находящихся в работе на данный момент, но и сделать существенный шаг для облегчения такой работы в будущем, так как на этом этапе стало очевидно, что ВЗН генотипа 1 наиболее часто встречающиеся на территории России. Необходимо было подобрать такой набор праймеров, учитывая три основных параметра: положение последовательности на геноме (расстояние между соседними праймерами должно быть примерно 500 нуклеотидов, исходя из среднего достоверного результата секвенирования в 600-800 нуклеотидов), положение праймера в консервативном участке генома (праймер должен эффективно работать с последовательностями различных штаммов 1-го генотипа), качество определения последовательности в реакции секвенирования (достаточно сложно предсказываемый параметр, зависящий не только от последовательности и свойств самого олигонуклеотида, но и от фланкирующих последовательностей на геноме). Для определения оптимального набора праймеров для секвенирования полных геномов ВЗН генотипа 1 большой набор праймеров был использован на матрицах ПЦР-фрагментов, полученных с 10 различных штаммов ВЗН. В результате был подобран оптимизированный набор праймеров, позволяющий с наименьшими затратами определить полную последовательность генома ВЗН субгенотипа 1a.

1.3. Определение и анализ 5'-концевых последовательностей геномов штаммов ВЗН

Для определения 5'-концевой последовательности геномов штаммов ВЗН использовали кДНК, полученную с помощью праймера 3594RUni. На 3'-концевую последовательность кДНК с помощью терминальной трансферазы

присоединяли последовательно 12-20 нуклеотидов С, затем амплифицировали ПЦР фрагмент с помощью праймера, имеющего структуру 5'-tgattaagaatcatgtgtctatgggggggggg-3' и подходящего для генотипа обратного праймера, отстоящего от 5'-конца генома не более чем, на 1000 нуклеотидов. Полученный ПЦР-продукт использовали в качестве матрицы для секвенирования с другим обратным праймером, находящимся к 5'-концу генома ближе, чем праймер, использованный для ПЦР. Результаты, полученные этим методом показаны на рис.2. Для большинства штаммов результаты были получены достоверные, хорошего качества, за исключением штамма Krsn88-190. В случае штамма 4-го генотипа, более достоверным представляется 5'-начало генома с нуклеотидов 5'-TGTAGTT, а не 5'-AGTAGTT, как у остальных анализируемых штаммов.

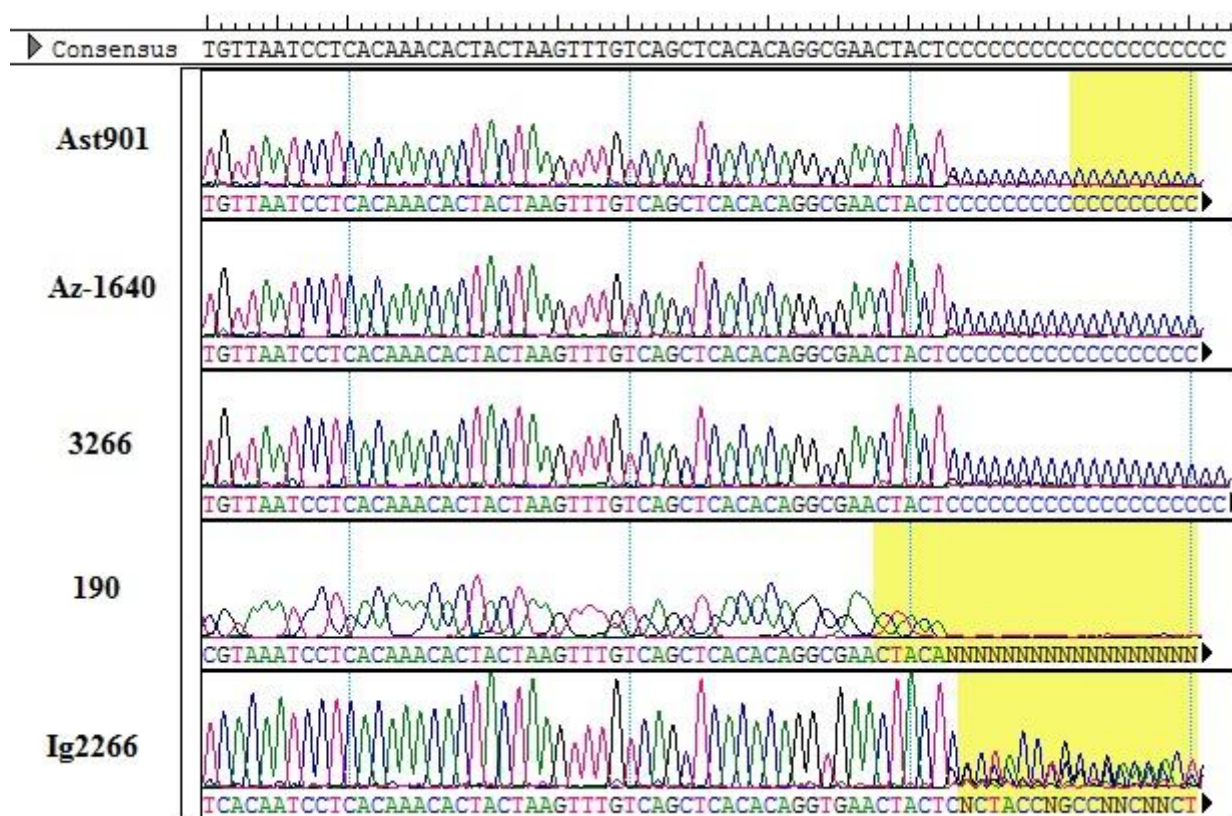


Рис. 2 Определение 5'- концевой последовательности геномов для генотипов 1, 2, 4 и 5 ВЗН.

2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей штаммов ВЗН

2.1. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей штаммов ВЗН первого генотипа

Четыре штамма ВЗН были изолированы во время эпидемии 1999-2000 гг. (Ast99-901, Ast99-986, Vlg27889 (секционный материал) и Vlg27924) из крови больных людей, штамм Нр94, был изолирован в дельте Волги из клеща *Hyalomma. marginatum* в 1963 году и использовался для сравнения. Филогенетический анализ этих штаммов показал, что все они относятся к субкластеру 1а первого генотипа ВЗН. Эти пять штаммов мы использовали в данной работе как референтные для анализа первичной структуры исследуемых штаммов ВЗН 2001-2005 года. Нуклеотидные последовательности всех 18-ти штаммов ВЗН были депонированы в международный банк данных GenBank.

Анализ первичной структуры геномов состоял из нескольких этапов. Сначала, с помощью программного пакета DNASTAR (*Lasergene*), мы определили процент нуклеотидного сходства, или идентичности, нуклеотидных последовательностей новых (2001-2005гг.) и пяти референтных (Ast99-901, Ast99-986, Vlg27889, Vlg27924 и Нр94) штаммов. Результат представлен в таблице 1. Как видно из приведенных данных, процент нуклеотидной идентичности между новыми исследуемыми штаммами 2001-2005 годов варьировал от 99,6% до 99,9%, а между новыми и выделенными в 1999-2000 гг. Ast99-986 и Ast99-901 - от 99,1% до 99,7% соответственно. Процент нуклеотидной идентичности между старым штаммом НР-94 и остальными (включая Ast99-986 и Ast99-901) составлял 94,5%-94,9%. Таким образом, штамм НР-94 1963 года был максимально и равным образом удален от всех новых (2001-2005 гг.) и двух референтных Ast99-986 и Ast99-901 (1999г.) штаммов. Процент нуклеотидной идентичности между старыми штаммами (Еg101, Az-72, Az-1628, Az-1640, 1304Taj) и остальными (включая

Ast99-986 и Ast99-901) составлял 94,6%-95,2%. Кроме того, штаммы из Волгограда 1999-2000 гг. отличались от штаммов из Астрахани того же времени, процент нуклеотидной идентичности между ними составлял 96,2%-96,4%.

Затем, с помощью полученных данных мы оценили эволюционную генетическую дистанцию между штаммами вируса Западного Нила, изолированными в 2001-2005 годах и его более ранними вариантами, которые циркулировали на территории Астраханской области.

Таблица 1. Процент нуклеотидной идентичности и дивергенции между исследуемыми и референтными штаммами ВЗН

Percent Identity																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24					
Divergence	1				99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.7	96.4	96.4	95.2	94.8	95.0	95.1	95.1	94.7	1	AstI01-66.seq			
	2	0.2			100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	96.6	96.4	96.4	95.3	94.9	95.0	95.1	95.1	94.8	2	AstI01-182.seq		
	3	0.2	0.0			99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	96.6	96.4	96.4	95.3	94.9	95.0	95.1	95.1	94.8	3	AstI01-187.seq		
	4	0.3	0.2	0.2			99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.9	99.9	99.8	99.7	99.7	99.5	96.2	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.6	4	AstI02-2-25.seq	
	5	0.2	0.2	0.2	0.0			99.9	100.0	100.0	99.9	99.9	100.0	99.9	99.8	99.8	99.8	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	5	AstI02-2-26.seq		
	6	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1			99.9	100.0	99.9	99.9	99.9	100.0	99.8	99.7	99.8	95.6	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	6	AstI02-2-298.seq	
	7	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0	0.1			99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.7	99.7	96.8	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	7	AstI02-2-691.seq	
	8	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1			99.9	99.9	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	96.3	96.3	96.3	95.3	94.9	95.0	95.0	94.7	8	AstI02-2-692.seq		
	9	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			99.8	99.9	99.9	99.7	99.7	99.7	95.5	96.2	96.2	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.6	9	AstI02-3-146.seq
	10	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2				99.9	99.9	99.7	99.7	99.7	95.5	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	94.9	95.0	94.6	10	AstI02-3-165.seq
	11	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1			99.9	99.8	99.8	99.8	99.6	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	11	AstI02-3-208.seq	
	12	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0			99.8	99.7	99.8	99.6	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	12	AstI02-3-570.seq	
	13	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2			99.7	99.7	99.5	96.3	96.3	95.2	94.8	94.9	95.0	95.0	94.7	13	AstI02-3-717.seq	
	14	0.0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3			99.8	99.6	96.3	96.3	95.2	94.8	95.0	95.0	95.0	94.7	14	AstI04-2-824A.seq	
	15	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2			99.8	96.4	96.4	95.3	94.8	95.0	95.1	95.1	94.7	15	901-Astseq	
	16	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1			96.2	96.2	95.2	94.8	95.0	95.1	95.1	94.7	16	AstI986.seq	
	17	3.8	3.7	3.7	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.7	3.7		99.9	95.3	94.9	95.1	95.2	95.2	94.9	17	LEIV-27889/Vig seq		
	18	3.8	3.7	3.7	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.7	3.7	0.1		95.3	94.9	95.1	95.2	95.2	95.0	18	LEIV-27924/Vig seq		
	19	4.9	4.9	4.9	5.0	4.9	5.0	4.9	5.0	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0	4.9	4.9	4.8	4.9	4.9		99.3	97.6	97.7	97.7	96.4	19	Eq101.seq		
	20	5.5	5.3	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.5	5.5	5.4	5.4	5.5	5.5	5.4	5.3	5.4	5.4	0.6		97.2	97.3	97.3	96.0	20	Hp-94.seq		
	21	5.2	5.2	5.2	5.3	5.2	5.3	5.2	5.2	5.3	5.3	5.2	5.3	5.3	5.2	5.0	5.0	5.0	5.0	2.3	2.8		99.9	99.9	98.2	21	LEIV-7242.seq		
	22	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.3	5.3	5.2	5.2	5.3	5.2	5.0	5.0	5.0	2.3	2.8	0.1		100.0	96.3	22	LEIV-1628A2.seq		
	23	5.1	5.1	5.1	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.3	5.3	5.2	5.2	5.2	5.2	5.1	5.0	5.0	5.0	2.3	2.8	0.0	0.0		96.3	23	LEIV-1640A2.seq	
	24	5.6	5.5	5.5	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.4	5.3	5.3	3.6	4.1	3.8	3.8			24	LEIV-1304Taj.seq		

Эволюционная дистанция (*p-distance*) между двумя очень близкими последовательностями может быть определена в простейшем случае как $p = N_d / N$, где N_d – число наблюдаемых нуклеотидных замен, а N – общее число нуклеотидов. Отметим также, что в данном случае она может также пониматься и как средняя частота замены каждого нуклеотида, и как процент нуклеотидной дивергенции между анализируемыми последовательностями. Как видно из табл. 19, нуклеотидная дивергенция между новыми штаммами ВЗН варьирует от 0,1-0,4%, а ее вычисленное среднее значение составляет 0,22%. Таким образом, средняя наблюдаемая генетическая дистанция между новыми штаммами составляет 0,22%. Вычисленное среднее значение

эволюционной дистанции между новыми штаммами и штаммами ВЗН 1999 года составляет 0,28%, а эволюционная генетическая дистанция между старым Нр-94 1993 года и всеми остальными - 5,42%. Более наглядно генетическое родство старого и новых астраханских штаммов ВЗН иллюстрирует филограмма, изображенная на рис. 3.

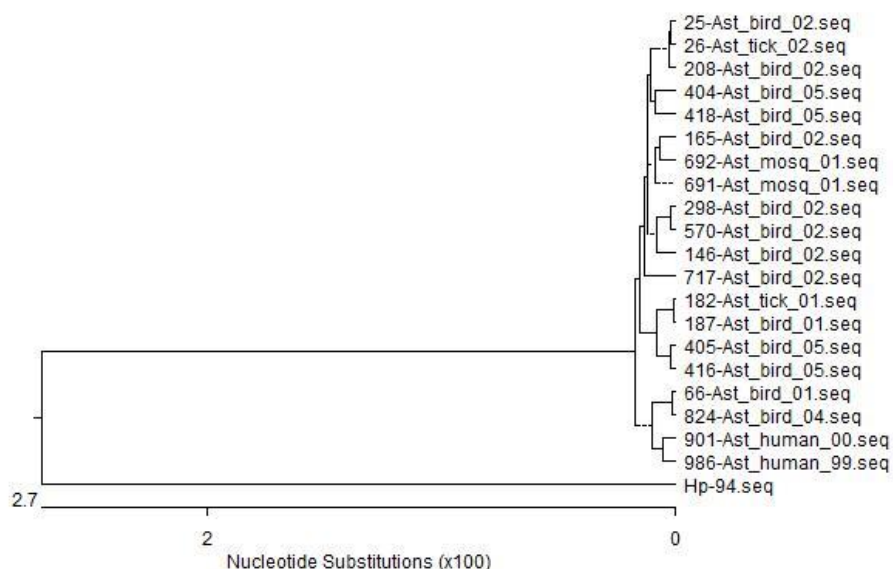


Рис.3. Генетическое родство штаммов ВЗН, выделенных на территории Астраханской области

Все нуклеотидные замены между исследуемыми новыми штаммами ВЗН и штаммами ВЗН 1999 г. Ast99-901 и Ast99-986, суммированы в таблице 2. Общее число нуклеотидных замен в новых штаммах варьирует от 16 до 34. Большинство из них (больше 80%) являются синонимическими и, не приводят к замене аминокислот. Наиболее часто встречаются замены пиримидин на пиримидин. Так, замена $C \rightarrow U$ наблюдается в 36%, обратная ей $U \rightarrow C$ также в 36%. Заметно реже встречаются замены пурин на пурин $A \rightarrow G$ (5%) и $G \rightarrow A$ (11%). Еще более редкими являются замены пурин на пиримидин $A \rightarrow C$ (3%), $A \rightarrow U$ (4%), $G \rightarrow U$ (<1%). Замены пиримидин на пурин ($C \rightarrow A$, $U \rightarrow A$, $U \rightarrow G$) встречались менее, чем в 1% случаев. Совсем не обнаружилось замен $C \rightarrow G$ и $G \rightarrow C$.

Хотя, большая часть нуклеотидных замен является синонимическими,

их распределение по геному не является совершенно случайным. Из таблицы 2 видно, например, что нуклеотидные замены в 5'-нетранслируемой области, а также в области генома, кодирующей капсидный белок и белок М, почти не встречаются.

Характерным является также то, что позиции, в которых происходили нуклеотидные замены в разных штаммах, часто совпадали. Так, например, в гене, кодирующем белок Е, в позициях генома 2319 и 2409 у большинства штаммов происходила синонимическая замена $C \rightarrow U$ и $A \rightarrow U$, соответственно (рис. 4).

	2320	2410
25-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
26-Ast_tick_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
66-Ast_bird_01	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
146-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
165-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
182-Ast_tick_01	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
187-Ast_bird_01	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
208-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
298-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
404-Ast_bird_05	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
405-Ast_bird_05	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
416-Ast_bird_05	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
418-Ast_bird_05	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
570-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
691-Ast_mosq_01	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
692-Ast_mosq_01	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
717-Ast_bird_02	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATTGCTCTCACG
824-Ast_bird_04	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
901-Ast_human_00	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
986-Ast_human_99	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
Hp-94	GCATTCCGTTCACTGTTT	CAGGTCCATAGCTCTCACG
	A F R S L F	R S I A L T

Рис. 4. Характерные нуклеотидные позиции в гене Е.

Аналогично, в гене, кодирующем неструктурный белок NS5, в позициях генома 8401, 10305 и 10314 встречаются синонимические замены $C \rightarrow U$ (рис. 5). В 6-ти позициях вирусного генома замены наблюдаются во всех новых штаммах (2361G $\rightarrow$ A, 4537G $\rightarrow$ A, 5185U $\rightarrow$ C, 6303U $\rightarrow$ C, 7452U $\rightarrow$ C и 8691U $\rightarrow$ C) относительно штаммов Ast99-901 и Ast99-986.

Хотя синонимические замены и не приводят к замене соответствующей аминокислоты, но, поскольку геном флавивирусов представлен одонитевой положительной РНК, которая не только кодирует вирусные белки, но и содержит важные для репликации вируса элементы вторичной и третичной

структуры, даже синонимические нуклеотидные замены могут, тем не менее, влиять на репродукцию вируса через структуру и функции вирусной РНК.

	8400	10300	10310	10320
25-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGGGCAAT	TATTGGAGAT	
26-Ast_tick_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGGGCAAT	TATTGGAGAT	
66-Ast_bird_01	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
146-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
165-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
182-Ast_tick_01	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	TATTGGAGAT	
187-Ast_bird_01	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	TATTGGAGAT	
208-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
298-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
404-Ast_bird_05	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	TATTGGAGAT	
405-Ast_bird_05	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	TATTGGAGAT	
416-Ast_bird_05	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	TATTGGAGAT	
418-Ast_bird_05	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
570-Ast_bird_02	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
691-Ast_mosq_01	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
692-Ast_mosq_01	AGGTGCTTTTGGGAAGAA	AACCAAGTTAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
717-Ast_bird_02	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
824-Ast_bird_04	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
901-Ast_human_00	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
986-Ast_human_99	AGGTGCTTCTGGGAAGAA	AACCAAGTCAGAGCAAT	CATTGGAGAT	
Hp-94	AGGTGCTTCTGGGAAGAA			
	V L L G R	N Q V R A I I G D		

Рис.5. Характерные нуклеотидные позиции в гене NS5.

Рис.6 иллюстрирует распределение характерных позиций относительно геномной вирусной РНК. Характерными мы считали позиции, в которых замены происходили минимум в 10-ти из 18-ти исследуемых штаммов относительно сразу двух референтных штаммов – Ast-901 и Ast-986. Синонимические замены обозначены зеленым цветом, а замены, приводящие к замещению аминокислот – красным (число в скобках означает количество изолятов ВЗН, у которых в данной позиции генома имеется нуклеотидная замена).

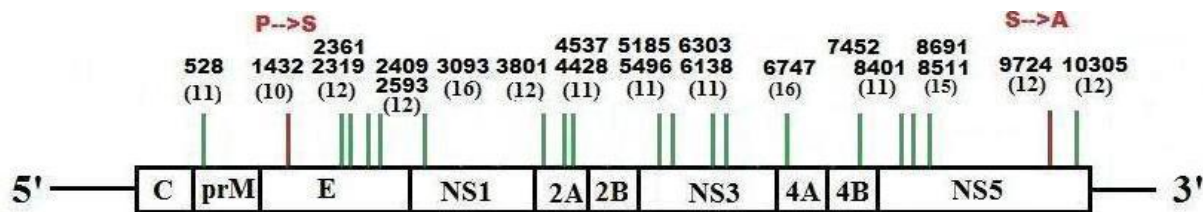


Рис.6. Расположение характерных позиций в геноме изолятов ВЗН относительно двух референтных штаммов Ast99-901 и Ast99-986.

Таблица 2. Аминокислотные различия между штаммами ВЗН

	<i>C</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>NS1</i>	<i>NS2A</i>	<i>NS2B</i>	<i>NS3</i>	<i>NS4A</i>	<i>NS4B</i>	<i>NS5</i>
<i>Ast99-901</i>			156S			105V				
<i>Ast99-986</i>			156P			105I				
<i>Ast01-66</i>			156P	169L→M						
<i>Ast01-182</i>			156P							
<i>Ast01-187</i>			154S, 156S							
<i>Ast02-2-25</i>			156P/S			101R→K	125A→G			682S→A
<i>Ast02-2-26</i>			156P							682S→A
<i>Ast02-2-298</i>			156S			66A→V				682S→A
<i>Ast02-3-208</i>			156P							682S→A
<i>Ast02-3-691</i>			156P							682S→A
<i>Ast02-3-692</i>			156S	128L→I						682S→A
<i>Ast02-3-146</i>			28S→N 154N/K 156P/S							682S→A
<i>Ast02-3-165</i>	21M→K		48M→V 156Y							682S→A
<i>Ast02-3-570</i>			156S			66A→V				253L→I 682S→A
<i>Ast02-3-717</i>			156S			158N→S				41K→Q 682S→A
<i>Ast04-824A</i>			156P	169L→M						
<i>Ast05-404</i>			156S, 207G→E				465N→S	61G→S	215S→N	682S→A
<i>Ast05-405</i>			156S							134Y→F
<i>Ast05-416</i>			154S, 156S							134Y→F
<i>Ast05-418</i>			154I, 156S							682S→A

Число аминокислотных замен, выявленных при сравнении штаммов ВЗН 2001-2005 гг. с двумя референтными штаммами Ast99-901 и Ast99-986, варьирует от одной до пяти (таблица 2). Степень аминокислотного сходства, таким образом, составляет больше 99,8%. Аминокислотные замены наблюдаются как в структурных, так и в неструктурных белках вируса и, как правило, носят индивидуальный характер. Исключение составляют замена 169L→M в белке NS1 у штаммов Ast01-66 и Ast04-824, замена 66A→V в белке NS2B у Ast02-2-298 и Ast02-3-570, а также замена 134Y→F у Ast05-405 и Ast05-416. Однако, глядя на филограмму на рис. 6, можно сделать вывод о том, что эти замены не являлись следствием независимых эволюционных событий.

Одна аминокислотная замена S→A в позиции 682 белка NS5 встречается у 12-ти из 18-ти анализируемых штаммов. Эта аминокислотная позиция локализована в С-концевом полимеразном домене самого большого и самого консервативного флавивирусного белка NS5, между двумя α -спиралями. Интересно, что у представителей других генетических линий ВЗН в этом положении находится только серин (данные не представлены), а у вирусов японского энцефалита, желтой лихорадки и Денге также встречается аланин. Это свидетельствует о неслучайном характере этой аминокислотной замены и ее возможном биологическом значении для функциональных или структурных свойств белка.

Как показал филогенетический анализ, из ВЗН выделенных до 1999 г. к первому генотипу (если точнее к субгенотипу 1a) относятся 6 штаммов: 3 штамма выделенных в Азербайджане (1967 и 1970 гг.); штамм Т-1304, выделенный в 1977 г. в Таджикистане; штамм Нр-94 (Астрахань 1963 г.) и классический штамм из Египта (Eg101) 1951 г. Причины, по которой они рассматриваются отдельно от других штаммов первого генотипа, описываемых в данной работе следующие. Во-первых, их анализ проводился в условиях, когда в базе данных была фактически только одна последовательность полного генома ВЗН субгенотипа 1a, поэтому сама работа по подбору праймеров и проведению секвенирования полного генома этих

вирусов резко отличается от аналогичной проведенной позднее для штаммов, выделенных после 1999 г., когда были подобраны совершенно другие схемы по оптимальной амплификации фрагментов и праймеры для секвенирования. Во-вторых, при филогенетическом сравнении группы более ранних штаммов ВЗН первого генотипа (1a) со штаммами, выделенными в Астраханской области в 2001-2005 гг. хорошо заметно их отличие. (рис.7)

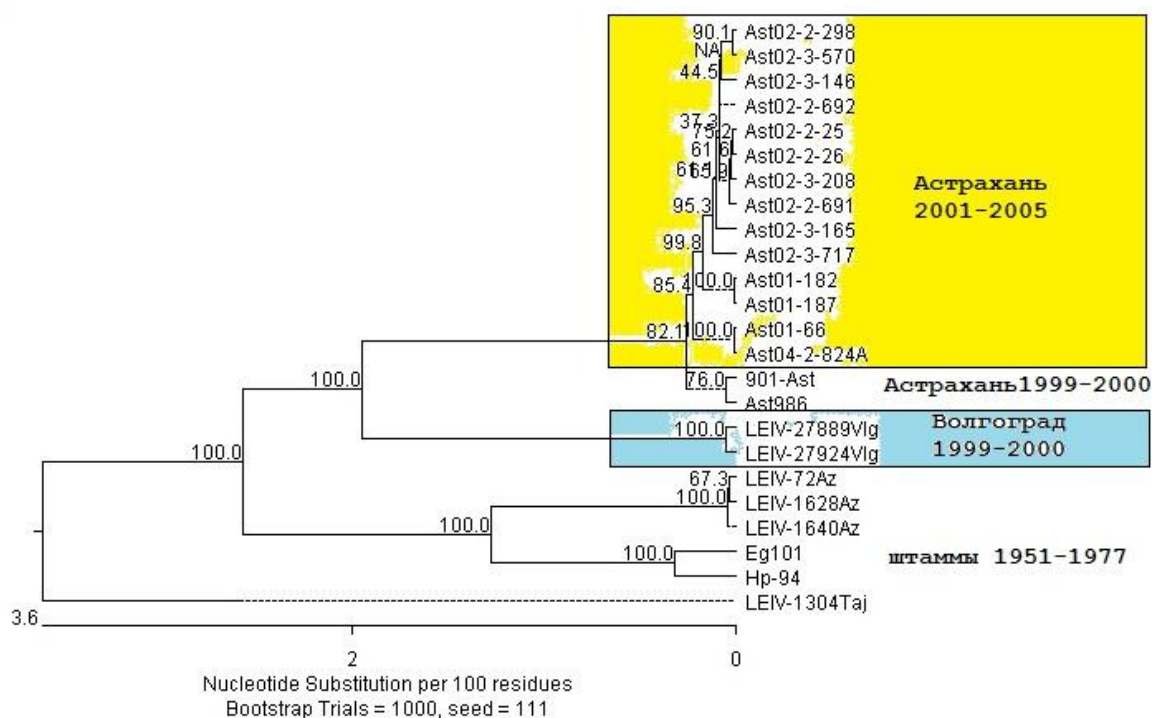


Рис. 7. Сравнение штаммов ВЗН генотипа 1a, выделенных в разные годы на территории Астраханской и Волгоградской областей, штамм 1304Taj из Таджикистана взят в качестве аутгруппы.

Следует отметить, что штаммы ВЗН, выделенные в Волгограде и Астраханской области в 1999-2000гг. существенно различаются, что говорит об отсутствии взаимосвязи между этими эпидемическими вспышками. С другой стороны, современные штаммы из Астраханской области достаточно сильно удалены от штамма Hp-94 (Астрахань 1963 г.), который, в свою очередь, близок к штамму из Египта 1951 г.

В целом, можно констатировать, что фактор времени изоляции штаммов ВЗН

более значим, чем, территориальный фактор, но в тоже время, в одно и тоже время вирусы, выделенные на разных территориях отличаются.

2.2. Анализ штамма 3266 генотипа 2

При сравнении полной последовательности генома штамма 3266 с последовательностями других штаммов, для которых были известны полные последовательности геномов, стало очевидно, что штамм 3266 принадлежит ко второму генотипу ВЗН. Гомология с единственными штаммами второго генотипа, для которых были известны полные последовательности геномов была 98,6% при сравнении открытой рамки считывания.

Табл. 3 Сравнение штамма 3266 со штаммами генотипов 1, 2, 4 и 5.

		Percent Identity																Divergence		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				
1		97.3	97.1	96.4	96.4	95.3	95.2	95.2	95.1	94.7	88.1	79.2	79.2	79.1	79.1	75.7	1	HNy-1999		
2	2.8		99.8	96.4	96.4	95.3	95.1	95.1	95.0	94.8	87.9	79.3	79.2	79.0	79.1	75.8	2	Ast901		
3	2.8	0.1		96.3	96.3	95.2	95.1	95.1	95.0	94.7	87.8	79.2	79.2	79.0	79.1	75.7	3	Ast986		
4	3.7	3.7	3.7		99.9	95.3	95.2	95.2	95.2	95.0	88.0	79.4	79.3	79.1	79.2	75.7	4	Vlg27889		
5	3.7	3.7	3.7	0.1		95.4	95.2	95.3	95.2	95.0	88.1	79.4	79.4	79.1	79.2	75.8	5	Vlg27924		
6	4.9	4.9	4.8	4.8	4.8		97.7	97.7	97.7	96.5	88.4	79.3	79.3	79.2	79.3	75.9	6	Eg101		
7	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	2.3		100.0	99.9	96.3	88.4	79.2	79.2	79.2	79.2	75.8	7	A-1628		
8	5.0	5.1	4.9	4.9	4.9	2.2	0.0		99.9	96.3	88.4	79.2	79.2	79.2	79.2	75.9	8	A-1640		
9	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	2.3	0.1	0.0		96.3	88.4	79.1	79.1	79.1	79.2	75.8	9	A-72		
10	5.6	5.4	5.4	5.2	5.2	3.6	3.8	3.7	3.8		88.2	79.5	79.4	79.3	79.4	75.8	10	T-1304		
11	13.3	13.5	13.5	13.4	13.4	12.9	12.9	12.9	12.9	13.2		78.8	78.8	79.1	79.1	75.7	11	Kunjin		
12	24.7	24.6	24.6	24.5	24.5	24.6	24.8	24.7	24.8	24.3	25.4		99.9	78.3	78.5	75.1	12	Ig2266		
13	24.7	24.6	24.6	24.4	24.4	24.5	24.7	24.7	24.7	24.3	25.3	0.0		78.3	78.4	75.1	13	Tyr-2914		
14	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.4	24.5	24.5	24.5	24.3	24.7	25.7	25.6		99.6	76.1	14	M12294 2nd		
15	24.6	24.6	24.5	24.5	24.4	24.3	24.4	24.4	24.4	24.1	24.6	25.5	25.5	0.4		76.2	15	3266		
16	29.6	29.4	29.4	29.6	29.5	29.3	29.4	29.3	29.4	29.7	30.5	30.4	28.8	28.6			16	190		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				

Единственное серьезное различие двух последовательностей – это делеции, расположенные в 3'-нетранслируемой области, после открытой рамки считывания полипептида.

До недавнего времени, не совсем ясен был вопрос о способности штаммов ВЗН второго генотипа вызывать эпидемии у людей. С одной стороны, не было известно ни об одной серьезной эпидемической вспышке, вызванной подобным вирусом, с другой стороны, вирусы ВЗН второго генотипа регулярно выделяются от людей (Южно-Африканская Республика,

Сенегал, Конго), собственно, самый первый штамм B956, давший название вирусу, выделенный в 1937г. в провинции Западный Нил (Уганда) из крови заболевшей женщины, принадлежал ко второму генотипу.

Тем не менее, до 2004 г. считалось, что ВЗН второго генотипа не вызывает заболеваний, по крайней мере тяжелых, у людей и лошадей. После 2004 г. ситуация резко изменилась. В 2004 г. было зафиксировано заболевание у людей, вызванное ВЗН второго генотипа в России, в 2004-2008 гг. в Венгрии, среди диких птиц в Австрии в 2008 г., серьёзная эпидемическая вспышка среди людей в Греции в 2010 г., в том же 2010 г. в Румынии, в 2011 г. в России и Италии, в 2012 г. в Италии (Сардиния) и Сербии, в 2013 г. в Италии и Хорватии. Несмотря на то, что заболевания, вызванные ВЗН не обнаружены в северной Европе, возможны случаи завоза из других стран. Так, например, случай с заболеванием 73-летней женщины из Бельгии, посетившей Грецию в 2012 г. Достаточно интересна в связи с вышесказанным структура потенциального сайта гликозилирования в белке Е.

Sequence Name	< Pos = 454
 Consensus	
24 Sequences	
	460 470 480 490
34977.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
57810.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
ArB357382.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
ArD76104.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Austria2008_g	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
B956.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
BD-AUT.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQAGATQAGRFSITPSAPSY
Congo1958.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Cz 13-104.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQAGATQAGRFSITPSAPSY
Cz 13-329.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQAGATQAGRFSITPSAPSY
Cz 13-479.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQAGATQAGRFSITPSAPSY
Cz 13-502.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQAGATQAGRFSITPSAPSY
goshawk-Hunga	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
H442.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
HS101_08.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Italy2013Rovi	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Italy2013Rovi	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Nea Santa-Gre	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Novi Sad-2010	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQMEATQAGRFSITPSAPSY
SA9301.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
Sad12.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
SPU11689.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
LEIV-3266Ukr.	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY
WNFCG.seq	KENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQIGATQAGRFSITPSAPSY

Рис. 8 Сравнение потенциальных сайтов гликозилирования в белке Е штаммов генотипа 2 ВЗН.

В более ранних штаммах таких, как ArD76104 (Сенегал 1990 г.), B956 (Уганда 1937 г.), LEIV3266 (Украина 1980 г.), WNFCG наблюдается делеция четырех аминокислот; у штамма ArB3573/82 (Центральноафриканская республика 1972 г.) сайт NYS заменен на DYS, у штамма из Конго 1958 г. сайт NYS заменен на NYP. Штаммы, выделенные в период эпидемических вспышек в Южной Европе (2004-2013 гг.) содержат мотив NYS в сайте потенциального гликозилирования белка E.

2.3. Анализ штамма Ksnd190 4-го генотипа

В процессе проведения работы по определению полной нуклеотидной последовательности генома штамма Ksnd190 стало очевидно, что данный штамм достаточно сильно отличается от других, использованных в данной работе. После анализа частичной последовательности генома штамма Ksnd190 это привело к изменению стратегии подбора праймеров для проведения секвенирования, а именно к отказу от использования универсальных праймеров и подбору их специально для данного штамма (раздел результаты). После определения полной последовательности генома штамма Ksnd190 и сравнении её с другими последовательностями ВЗН было показано, что уровень нуклеотидных различий между штаммом Ksnd190 и представителями как генотипа 1, так и генотипа 2 лежит в пределах 28.6–29.7 %. Уровень нуклеотидных различий между штаммом Ksnd190 и штаммом из Индии Ig2266 достигает 30.5%. *Следует отметить, что под уровнем нуклеотидных различий между штаммами понимается сумма различий первого штамма от второго плюс второго от первого, то есть, например, если между двумя последовательностями есть различие в 3 нуклеотида на каждые 100, что соответствует уровню замен в 3%, то уровень нуклеотидных различий между штаммами будет равен 6%.*

Эти данные указывают на то, что штамм Ksnd190 не принадлежит ни к одному из известных ранее генотипов ВЗН, а является представителем нового

генотипа (по современной классификации генотип 4).

Табл. 4 Сравнение штамма Ksnd190 со штаммами генотипов 1, 2 и 5.

		Percent Identity																
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
	1		97.3	97.1	96.4	96.4	95.3	95.2	95.2	95.1	94.7	88.1	79.2	79.1	79.1	75.7	1	HNY-1999
	2	2.8		99.8	96.4	96.4	95.3	95.1	95.1	95.0	94.8	87.9	79.3	79.0	79.1	75.8	2	Ast901
	3	2.8	0.1		96.3	96.3	95.2	95.1	95.1	95.0	94.7	87.8	79.2	79.0	79.1	75.7	3	Ast986
	4	3.7	3.7	3.7		99.9	95.3	95.2	95.2	95.2	95.0	88.0	79.4	79.1	79.2	75.7	4	Vlg27889
	5	3.7	3.7	3.7	0.1		95.4	95.2	95.3	95.2	95.0	88.1	79.4	79.1	79.2	75.8	5	Vlg27924
	6	4.9	4.9	4.8	4.8	4.8		97.7	97.7	97.7	96.5	88.4	79.3	79.2	79.3	75.9	6	Eg101
	7	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	2.3		100.0	99.9	96.3	88.4	79.2	79.2	79.2	75.8	7	A-1628
	8	5.0	5.1	4.9	4.9	4.9	2.2	0.0		99.9	96.3	88.4	79.2	79.2	79.2	75.9	8	A-1640
	9	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	2.3	0.1	0.0		96.3	88.4	79.1	79.1	79.2	75.8	9	A-72
	10	5.6	5.4	5.4	5.2	5.2	3.6	3.8	3.7	3.8		88.2	79.5	79.3	79.4	75.8	10	T-1304
	11	13.3	13.5	13.5	13.4	13.4	12.9	12.9	12.9	12.9	13.2		78.8	79.1	79.1	75.7	11	Kunjia
	12	24.7	24.6	24.6	24.5	24.5	24.6	24.8	24.7	24.8	24.3	25.4		78.3	78.5	75.1	12	Ig2266
	13	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.4	24.5	24.5	24.5	24.3	24.7	25.7		99.6	76.1	13	M12294 2nd
	14	24.6	24.6	24.5	24.5	24.4	24.3	24.4	24.4	24.4	24.1	24.6	25.5	0.4		76.2	14	3266
	15	29.6	29.4	29.4	29.6	29.5	29.3	29.4	29.3	29.4	29.4	29.7	30.5	28.8	28.6		15	190
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			

К настоящему времени в базе данных появилось еще 4 полных последовательности генома штаммов ВЗН 4-го генотипа: три из Волгоградской области (два штамма выделены в 2005 г. и один в 2006 г.), и один из Австрии 2013 г. выделения. В Волгограде и его окрестностях с помощью ПЦР "в реальном времени" были изучены ткани 95 озерных лягушек *Rana ridibunda* и около 1300 питающихся на земноводных комаров *Uranotaenia unguiculata*, собранных в 2002—2006 гг. в г. Инфицированность лягушек вирусом Западного Нила (ВЗН) составляла от 2 до 16%. Уровень инфицированности *U. unguiculata* достигал 5,7% (95% доверительный интервал 4,2—7,6%). Гомология нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E (973 п.о.) 44 изолятов из лягушек и *U. unguiculata* между собой и с последовательностью штамма LEIV-Krnd88-190 составляла 97,2—98,5%, т. е. все эти изоляты входили в генотип 4 ВЗН. Попытки заражения этими изолятами культур клеток млекопитающих и комаров, а также новорожденных белых мышей не принесли успеха. Цитопатогенный эффект в культуре и смертность мышей отсутствовали.

Анализ потенциального сайта гликозилирования в белке E N-X-S/T

показал во всех штаммах, кроме LEIV-Krnd88-190 наличие последовательности NLS, в штамме LEIV-Krnd88-190 в данном участке присутствует делеция двух аминокислот (рис. 9).

Sequence Name	< Pos = 440
- +	
☒ Consensus	TCSNKATGLTIQRENVKYEVAAFVHGPTTVDTHSNLSAQNAAVQAGRFSVSPAAPHTHTLTGL
5 Sequences	40 450 460 470 480 490 500
5_50-05-Uu.se	TCSNKATGLTIQRENVKYEVAAFVHGPTTVDTHSNLSAQNAAVQAGRFSVSPAAPHTHTMTLGL
8_1-05-Uu.seq	TCSNKATGLTIQRENVKYEVAAFVHGPTTVDTHSNLSAQNAAVQAGRFSVSPAAPHTHTLNLGL
101_5-06-Uu.s	TCSNKATGLTIQRENVKYEVAAFVHGPTTVDTHSNLSAQNAAVQAGRFSVSPAAPHTHTLTGL
Uu-LN-AT-2013	TCSYKATGLTIQRENVKYEVAAFVHGPTTVDTHSNLSAQSAAVQAGRFSVSPAAPSHHTLSLGL
LEIV-Krnd88-1	TCSNKATGLTIQRENVKYEVAVSFVHGPTTVDTHXMSAQNAAVQAGRFSVSPAAPHTHTLTGL

Рис. 9 Сравнение потенциальных сайтов гликозилирования в белке Е штаммов генотипа 4 ВЗН.

2.4. Анализ штамма Ig2266 5-го генотипа

На момент проведения данной работы информация о нуклеотидных последовательностях генома штаммов ВЗН, изолированных в Индии, была представлена крайне скудно. К 2002 году для определения родства штаммов ВЗН из Индии с другими представителями ВЗН было доступно несколько последовательностей гена Е (не всегда полных). На основании их сравнения с аналогичными последовательностями других штаммов ВЗН делался вывод о принадлежности этих штаммов в генотипу 1, субгенотипу 1с. В тоже время, сравнительные исследования изолятов ВЗН из Индии и представителей ВЗН генотипа 1 по таким характеристикам, как антигенные свойства, нейроинвазивность и патогенез в мышцах, указывали на заметные различия индийских изолятов и ВЗН первого генотипа. В данной работе, для более точной локализации положения штамма Ig2266 среди других представителей ВЗН, использовалась полная последовательность генома вируса. При сравнении полных последовательностей геномов, было показано, что уровень нуклеотидных различий между штаммом Ig2266 и представителями как

генотипа 1, так и генотипа 2 лежит в пределах 24–25 %. Исходя из того, что различия между генотипами 1 и 2 составляют 23–25 %, логично отнести индийский штамм Ig2266 к новому генотипу (в настоящее время - генотип 5).

Табл. 5 Сравнение штамма Ig2266 со штаммами генотипов 1, 2 и 4.

		Percent Identity																Divergence	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			
1		96.9	96.7	96.0	96.0	95.0	94.5	94.8	94.8	94.7	94.3	87.9	78.7	78.7	78.9	79.0	1	HNY-1999	
2	2.8		99.7	96.4	96.4	95.4	94.9	95.2	95.1	95.1	94.9	87.8	79.1	79.1	79.3	79.4	2	Ast901	
3	2.8	0.1		96.2	96.2	95.3	94.8	95.2	95.2	95.1	94.7	87.6	79.0	79.0	79.2	79.3	3	Ast986	
4	3.8	3.7	3.7		99.9	95.4	94.9	95.3	95.3	95.2	95.0	87.8	79.0	79.0	79.4	79.5	4	Vlg27889	
5	3.8	3.7	3.7	0.1		95.4	94.9	95.3	95.3	95.2	95.0	87.9	79.0	79.0	79.4	79.5	5	Vlg27924	
6	4.8	4.7	4.6	4.7	4.7		99.3	97.7	97.7	97.6	96.5	88.3	79.3	79.3	79.4	79.5	6	Eg101	
7	5.4	5.4	5.3	5.3	5.3	0.6		97.3	97.3	97.2	96.1	88.0	79.3	79.3	79.4	79.2	7	Hp-94	
8	5.0	5.1	4.8	4.9	4.9	2.2	2.8		100.0	99.9	96.3	88.2	79.0	79.0	79.3	79.4	8	A-1628	
9	5.0	5.1	4.8	4.9	4.9	2.2	2.8	0.0		99.9	96.3	88.3	79.0	79.0	79.3	79.3	9	A-1640	
10	5.0	5.1	4.9	4.9	4.9	2.3	2.8	0.1	0.0		96.3	88.2	79.0	79.0	79.3	79.3	10	A-72	
11	5.6	5.4	5.3	5.2	5.2	3.6	4.1	3.8	3.8	3.8		88.1	79.2	79.2	79.5	79.5	11	T-1304	
12	13.3	13.5	13.4	13.4	13.3	12.8	13.3	12.9	12.8	12.8	13.1		78.5	78.5	78.9	78.5	12	Kunjin	
13	24.2	24.1	24.0	24.3	24.2	23.8	24.4	24.2	24.2	24.1	23.9	24.6		100.0	98.6	77.9	13	M12294 2nd	
14	24.2	24.1	24.0	24.3	24.2	23.8	24.4	24.2	24.2	24.1	23.9	24.6	0.0		98.6	77.9	14	NC_001563 2nd	
15	24.4	24.3	24.2	24.1	24.1	24.0	24.2	24.2	24.2	24.2	23.9	24.6	0.8	0.8		78.3	15	3266	
16	24.4	24.3	24.2	24.1	24.1	24.1	24.8	24.3	24.4	24.3	24.1	25.2	25.6	25.6	25.4		16	Ig2266	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			

В дальнейшем, при определении полных нуклеотидных В дальнейшем, при определении полных нуклеотидных последовательностей других изолятов ВЗН их Индии, этот вывод был подтвержден другими авторами. Анализ потенциального сайта гликозилирования в белке Е в штамме Ig2266 показал последовательность SYS, что указывает на отсутствие гликозилирования данного участка белка.

В данной работе был проведен анализ еще одного штамма (Tyr2914), формально попадающего в 5-ый индийский генотип ВЗН, но так как при сравнении его полной нуклеотидной последовательности генома с последовательностью штамма Ig2266 не было обнаружено ни одной нуклеотидной замены, был сделан вывод о контаминации при культивировании вирусов, таким образом последовательности штамма Tyr2914 не закладывались в базу данных и в данной работе не анализируются.

3. Анализ генетических детерминант патогенности ВЗН

Отдельно, для всех исследуемых штаммов, были проанализированы

известные к настоящему моменту генетические детерминанты вируса ЗН, отвечающие за его патогенные свойства. К таким известным факторам патогенности вируса относится, в частности, потенциальный сайт N-гликозилирования оболочечного белка Е, находящийся в позиции 154-156 а.к.. Здесь расположен потенциальный сайт N-гликозилирования N-X-S/T у многих флавивирусов, включая ВЗН. На рис.10 показаны выровненные нуклеотидные и аминокислотные последовательности всех исследуемых штаммов, а также некоторых других, в области белка Е в районе 154-156 а.о. При анализе потенциального сайта N-гликозилирования штаммов ВЗН первого генотипа было обнаружено: у 6 из 18 современных штаммов из Астрахани (Ast02-2-298, Ast02-3-717, Ast02-3-570, Ast01-692, Ast05-404, Ast05-405) присутствует мотив NYS, а еще у трех (Ast02-2-25, Ast02-3-208, Ast01-182) изолятов при анализе хроматограмм секвенирования позиция 1434 н.п. гена Е оказалась гетерогенной и содержала смесь нуклеотидов C/U, обозначенная на рис. 45 как Y. Это свидетельствует об исходном генетическом полиморфизме гена Е в этих штаммах, который приводит к появлению соответствующей смешанной позиции серин/пролин позиции в белке Е. Таким образом, частично мотив NYS присутствует и в этих 3 штаммах. У остальных штаммов сайт гликозилирования отсутствует, а вместо мотива NYS присутствуют варианты – NYP (Ast01-66, Ast02-2-26, Ast04-824, Ast02-3-691), SYS (Ast01-187, Ast05-416), NYU (Ast02-3-165), IYS (Ast05-418). У штамма Ast02-3-146 гетерогенными оказались позиции 1427(A/C), обозначенная на рис. 45 как M, и 1434(C/U), что потенциально допускает частичное гликозилирование белка Е и в этом штамме. Референтные штаммы Ast99-901 и Ast99-986 имеют мотив NYS и NYP соответственно. Штамм Нр94 также содержит сайт гликозилирования NYS.

	1420	1430	1440	470	480
901-Ast	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
66-Ast_bird_01	TCGCACGGAACTACCTACGCAGAT			PTTVESHGNYPTQIGATQA	
26-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACCTACGCAGAT			PTTVESHGNYPTQIGATQA	
25-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACCTACGCAGAT			PTTVESHGNYPTQIGATQA	
208-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACCTACGCAGAT			PTTVESHGNYPTQIGATQA	
298-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
717-Ast_02	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
570-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
146-Ast_bird_02	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
165-Ast_02	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
182-Ast_tick_01	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
187-Ast_crow_01	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
691-Ast_mosq_01	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
692-Ast_mosq_01	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
404-Ast_05	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
405-Ast_05	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
416-Ast_05	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
418-Ast_05	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	
824-Ast_04	TCGCACGGAACTACTCTACGCAGAT			PTTVESHGNYSTQIGATQA	

Рис.10 Выровненные нуклеотидные и аминокислотные последовательности штаммов ВЗН в области гликозилирования белка Е.

У штаммов из Волгограда Vlg27889 и Vlg27924 в данной позиции расположены аминокислотные последовательности KYS и NYS, соответственно, что говорит о потенциально более высокой нейроинвазивности второго штамма. В тоже время, штамм Vlg27889 был изолирован из секционного материала от умершего больного. Как уже упоминалось выше, в опытах *in vivo* было показано, что дегликозилирование участка 154-156 а.к. вирусного белка Е приводило к аттенуации нейроинвазивности (но не нейровирулентности) в мышах. В коллекционных штаммах Eg101 и трех штаммах из Азербайджана присутствует мотив NYP, а в штамме из Таджикистана (1977 г.) – NYF, что говорит об отсутствии гликозилирования белка в этом сайте. Сайты гликозилирования в районе 154-156 а.к. вирусного белка Е для представителей 2, 4 и 5 генотипов вируса ЗН рассмотрены выше в соответствующих разделах, посвященных этим генотипам ВЗН.

Еще несколько важных потенциальных сайтов гликозилирования находятся в белке NS1 в аминокислотных позициях 130, 175 и 203. Мутанты вируса, дегликозилированные по двум или трем из них, вызывали

пониженную вирулентность и уменьшали уровень летальности *in vivo*. Все три потенциальных сайта гликозилирования белка NS1 сохранились во всех исследуемых и референтных штаммах.

Недавно был идентифицирован еще один важный генетический фактор патогенности вируса, связанный с 249 аминокислотой неструктурного белка NS3. Анализируя аминокислотные последовательности разных представителей вируса Западного Нила, относящихся к разным генетическим линиям, можно убедиться, что эта аминокислотная позиция является очень вариабельной. В частности, она может быть представлена треонином или пролином. Рис. 11 иллюстрирует вариабельность этой аминокислотной позиции среди представителей разных генетических линий ВЗН. Недавно с помощью эволюционного анализа было показано, что эта аминокислота подвержена высокой адаптивной селекции и, по-видимому, играет важную роль в приспособлении вируса к популяциям различных хозяев.

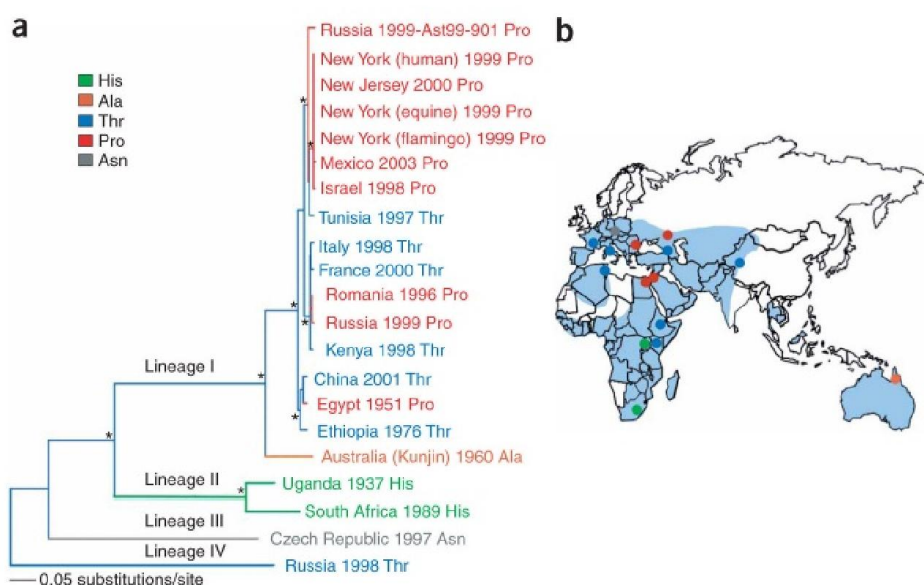


Рис. 11 Вариабельность позиции 249P в белке NS3 среди различных генетических линий ВЗН (а) и ее связь с географическим распределением ВЗН (б). Иллюстрация взята из работы Brault et. al., 2007.

В опытах *in vivo* было показано, что в низкопатогенном исходно для американского вида ворон *Corvus brachyrhynchos* штамме ВЗН, единственная замена в белке NS3 по позиции 249 треонина на пролин приводила к

существенному изменению патогенных свойств вируса с увеличением титра виремии больше, чем в 10^5 раз и повышением уровня смертности до 94% (против исходного в 31%). Напротив, в исходно высокопатогенном штамме обратная замена 249 пролин на треонин приводила к снижению титра виремии с $9.4 \log_{10}$ до $3.6 \log_{10}$ Б.О.Е, а уровень смертности снизился со 100% до 12,5%. Оба штамма принадлежали к первой генетической линии и имели дополнительно 11 аминокислотных различий в геноме. Все штаммы, выделенные в Астраханской области в 1999-2005 гг., включая референтные Ast99-901, Ast99-986, а также штамм Нр94 1963 года, имеют в данной аминокислотной позиции пролин и, таким образом, содержат в себе важный фактор патогенности ВЗН.

4. ОТ-ПЦР тест система для обнаружения РНК ВЗН

4.1. Создание ОТ-ПЦР тест системы для обнаружения РНК ВЗН в клинических образцах и пробах полевого материала.

Учитывая большую вариабельность генома ВЗН, при его обнаружении необходимо использовать праймеры, соответствующие наиболее консервативным участкам вирусного генома. В качестве таких участков-мишеней предлагается использовать те, которые совпадают по нуклеотидной последовательности в штаммах вируса ЛЗН, принадлежащих к различным филогенетическим группам. Одним из наиболее консервативных участков генома вируса является 5'- нетранслируемая область, область гена *core* и *pre-M*. В связи с этим, основой для поиска мишеней стало сопоставление нуклеотидных последовательностей по всей длине генома для ВЗН с помощью программы Megalign (DNASTAR).

Для синтеза на матрице вирусной РНК комплиментарной ДНК был предложен праймер 626R. Здесь и далее номерное обозначение праймера соответствует позиции его посадки на геноме вируса ЗН. Буквами R и F

обозначаются праймеры обратной и прямой (соответственно) посадки. Место посадки праймера 626R расположено в области гена preM, при этом в реакции обратной транскрипции синтезируется кДНК длиной 626 н.о. Для последующего проведения на матрице полученной кДНК ПЦР, были подобраны две пары праймеров. Первая пара 1F и 518R для использования в первом раунде ПЦР и праймеры 26F и 518R для второго раунда (полугнездовой вариант). Для повышения чувствительности и специфичности тест-системы был разработан гнездовой вариант, с использованием во втором раунде ПЦР пары праймеров 26F и 326R.

Таблица 6. Праймеры, подобранные для детекции ВЗН методом ОТ-ПЦР (гнездовой способ)

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина (н.о.)	Место посадки (позиция на геноме)	Расчетная температура отжига (°C)
2F	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGA	23	1 – 23 (5'НТР)	64,6
26F	AACTTAGTAGTGTTTGTGAGGA	22	26 – 47 (5'НТР)	56,4
326R	GCTGTTTGTTCACACCTCTCCA	26	326-352	66,2
518R	TCAGTAGCATTTACCGTCATCAT	23	496-518 (preM)	59,2
626R	GGGCATTCATAAGTGATAGTATC	23	627-650 (preM)	59,1

Предложенный способ включает в себя две основные стадии. Первая - это построение кДНК-копии части генома вируса ЗН с помощью обратной транскриптазы. Матрицей для этой реакции служит одноцепочечная РНК вируса ЗН, а затравкой – праймер 626R, комплементарный

последовательности участка генома вируса ЛЗН, кодирующей лидер белка М. Результатом этой реакции является гибридная РНК-ДНК молекула, которая служит матрицей для последующей амплификации с внешней парой праймеров. Вторая стадия состоит из двух последовательных амплификаций с двумя различными парами праймеров – внешней и внутренней. Матрицей для первой амплификации (с внешней парой праймеров 2F и 518R) служит гибридная РНК-ДНК молекула, получающаяся в результате реакции обратной транскрипции, а матрицей для второй амплификации (с внутренней парой праймеров 26F и 326R) – фрагмент, полученный в результате первой амплификации. Следует отметить, что использование разных пар праймеров при двойной амплификации существенно улучшает специфичность конечного продукта. По этой же причине для синтеза кДНК цепи используется праймер, отличный от праймеров, используемых для амплификации.

Разработанная тест – система «Способ обнаружения вируса лихорадки Западного Нила», авторы изобретения: Прилипов А.Г., Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Садыкова Г.К., Альховский С.В., Воронина А.Г. защищена патентом РФ №2199589 от 27.02.2003.

4.2. Разработка параметров проведения ПЦР для первого и второго раундов амплификации

Для определения оптимальных температурных режимов проведения амплификации был проведен анализ вариабельности последовательностей генома ВЗН в местах посадки выбранных праймеров. Праймеры 2F и 26F полностью соответствуют последовательностям первого генотипа, праймер 26F не имеет некомплементарных нуклеотидов для всех генотипов, праймер 2F имеет от одной до трех замен для генотипов 3-5. Праймер 326R имеет от одной до двух замен для генотипов 2-5. Праймер 518R имеет от одной до четырех замен для генотипов 1-5.

Для определения наиболее оптимальных температур отжига праймеров при проведении первого и второго раундов ПЦР были поставлены серии

реакций амплификации с градиентом по температуре отжига праймеров на матрице. В качестве матриц использовались кДНК штаммов Ast986 и Krnd88-190, представляющих первый и четвертый генотипы вируса соответственно. Это было сделано в связи с наличием замен в штамме Krnd88-190 в местах посадки праймеров и ожидаемой более низкой температурой, требуемой для отжига на матрице этого штамма.

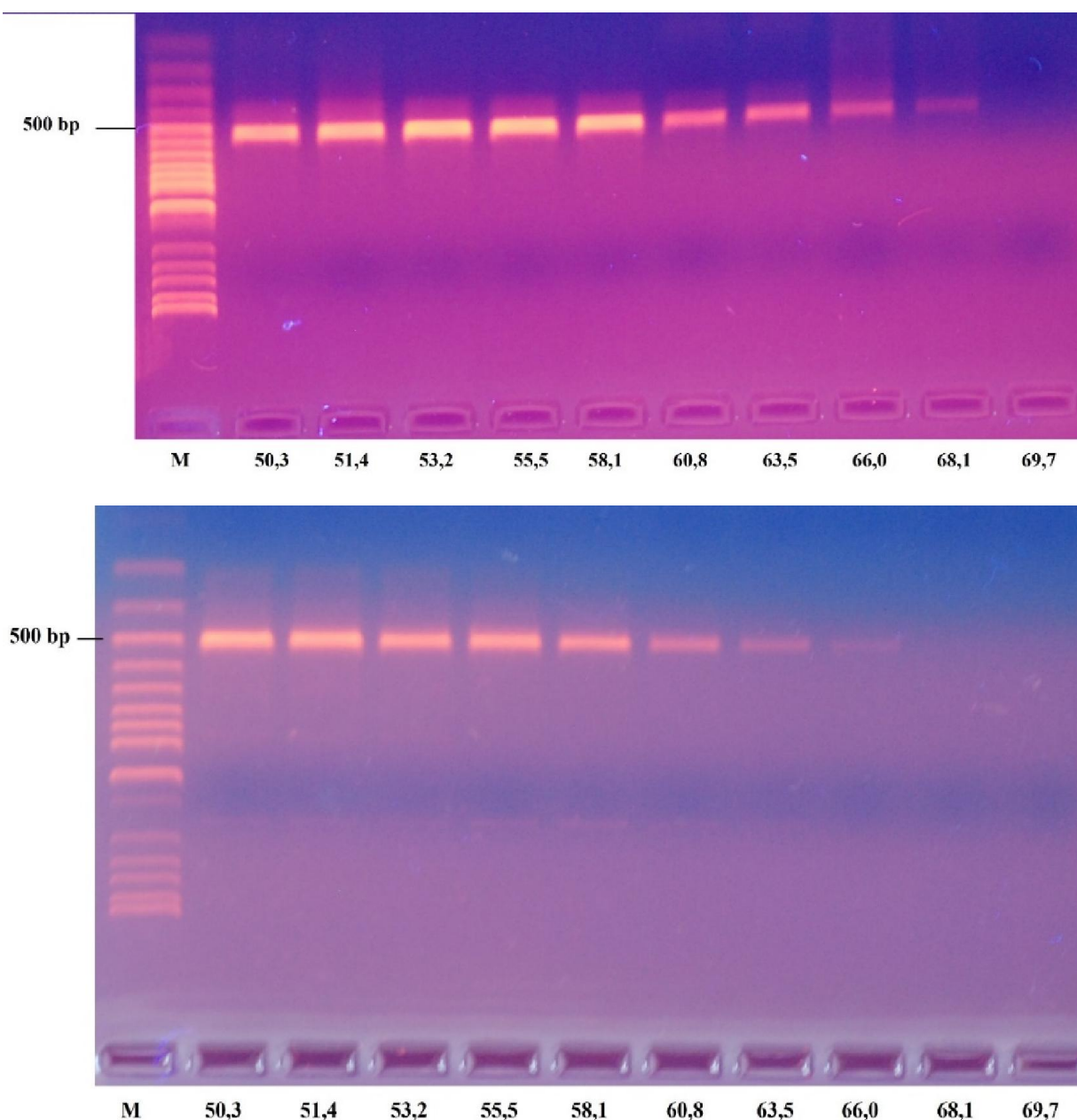


Рис. 12 Проведение первого раунда ПЦР на матрицах генотипов 1 (вверху) и 4 (внизу) вируса ВЗН с градиентом температур отжига праймеров.

На Рис.12 видно, что первый раунд ПЦР с парой праймеров 2F и 26F проходит до температур отжига 68.1°C и 66°C для генотипов 1 и 4, соответственно, но

выше 58,1°C наблюдается существенное уменьшение целевого фрагмента. Для гарантированной работы системы при возможном появлении дополнительных замен в местах посадки праймеров была рекомендована температура отжига 55°C при проведении первого раунда ПЦР. При проведении аналогичного подбора температуры отжига праймеров 26F и 326R для второго раунда ПЦР существенных отличий для генотипов 1 и 4 не было обнаружено. Для второго раунда ПЦР была рекомендована температура отжига 60°C (Рис.13).

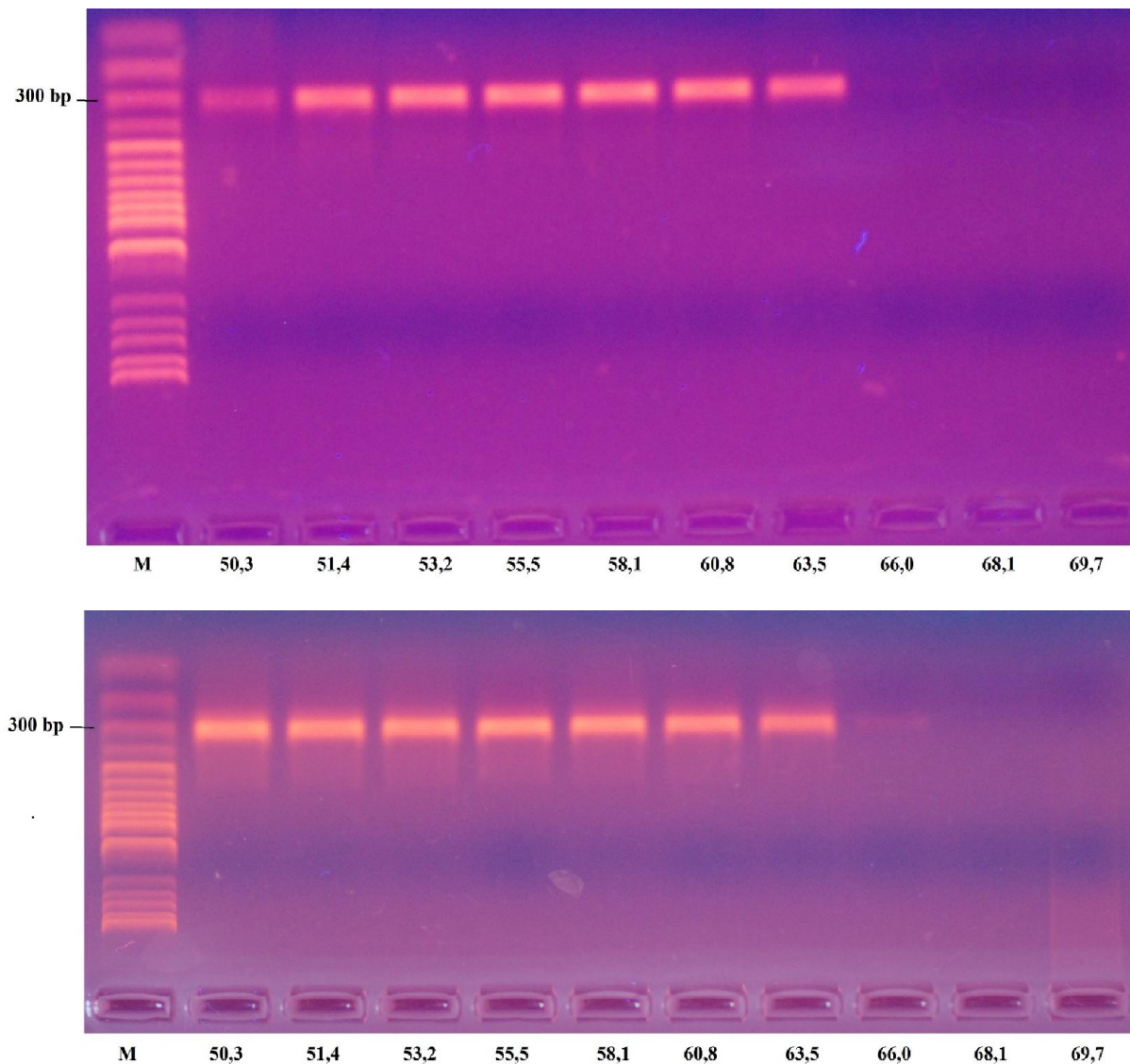
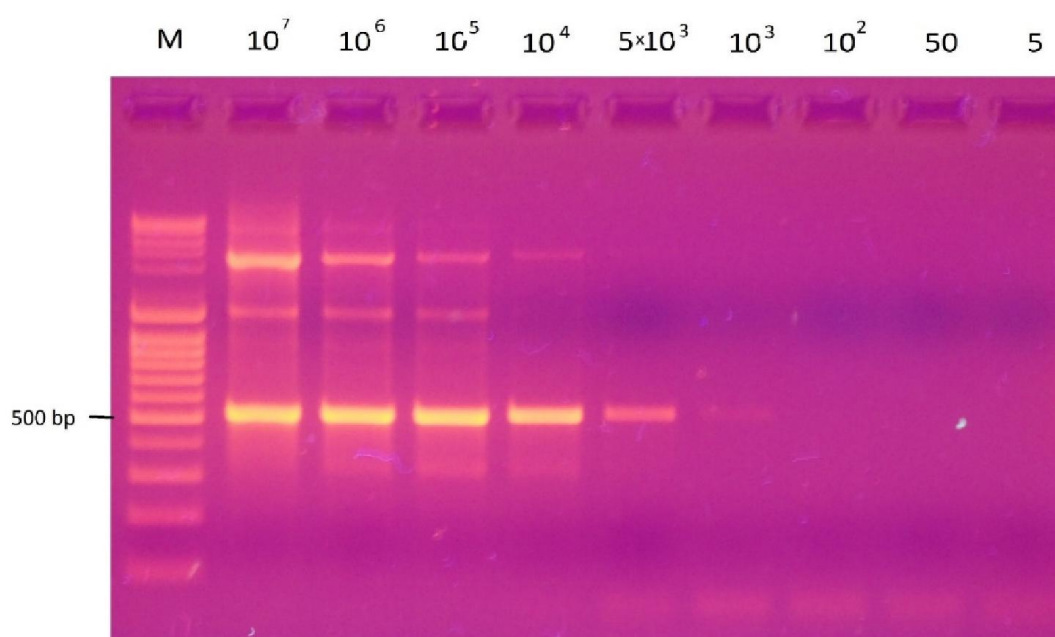


Рис. 13 Проведение второго раунда ПЦР на матрицах генотипов 1 (вверху) и 4 (внизу) ВЗН с градиентом температур отжига праймеров. Под лунками указаны соответствующие температуры отжига.

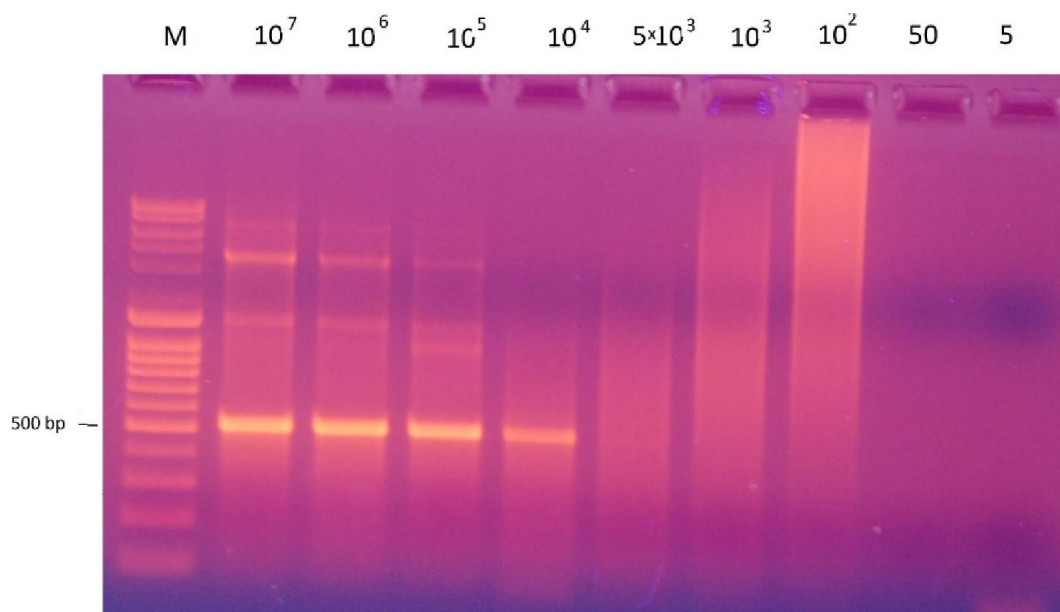
4.3. Определение чувствительности ОТ-ПЦР тест системы

Для определения чувствительности ОТ-ПЦР тест системы было проведено титрование штамма LEIV-Ast989 в культуре клеток Vero E6 и параллельное тестирование разведений вируса в ОТ-ПЦР. Титрование вируса проводилось методом бляшек под агаровым покрытием. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 14 А, Б, В.

А. Первый раунд



Б. Второй раунд (полугнездовой вариант)



В. Второй раунд (гнездовой вариант)

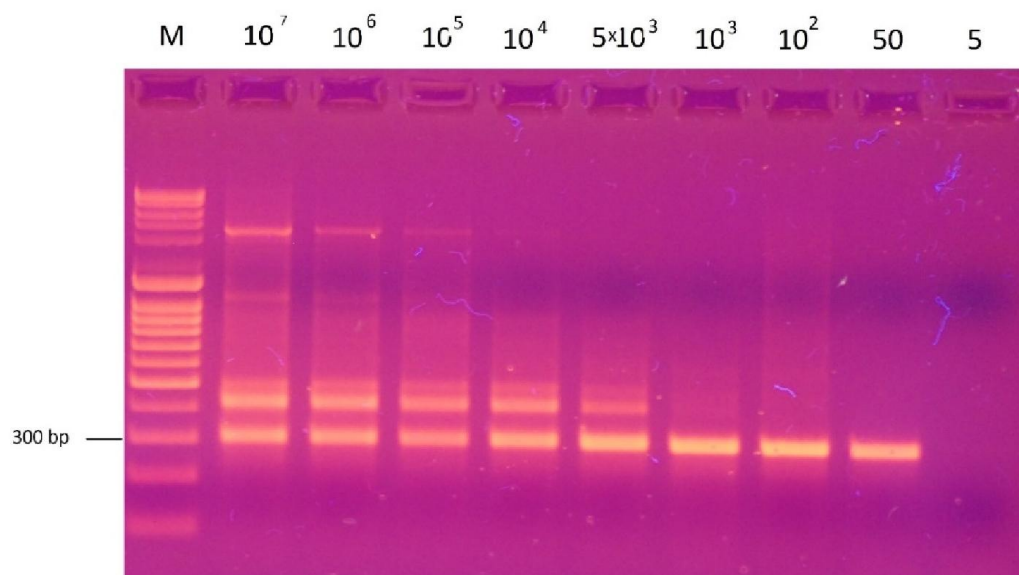
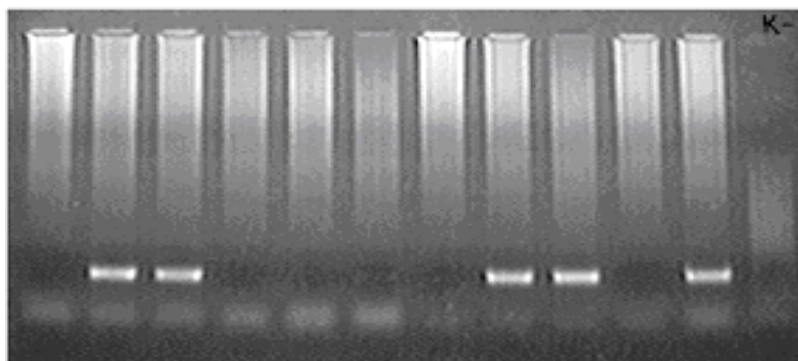


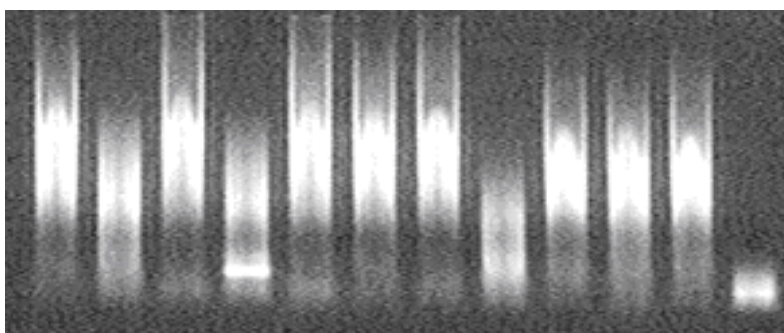
Рисунок 14. Определение чувствительности разработанной ОТ-ПЦР тест – системы (гнездовой). Результаты тестирования в ОТ-ПЦР разведений штамма Ast986 после I-го (А.) и II-го (Б,В) раундов ПЦР. Над лунками указан соответствующий титр вируса.

Как видно на электрофореграмме, после первого раунда ПЦР специфический, положительный ответ детектируется до разведения, соответствующего 10^3 БОЕ/мл., хотя четкий, хорошо видимый сигнал детектируется до разведения, соответствующего 10^4 БОЕ/мл. После второго раунда положительный ответ детектируется до разведения, соответствующего 50 БОЕ/мл. Что касается полугнездового варианта, то он продемонстрировал результаты даже хуже, чем однораундовый вариант. До разведения, соответствующего 10^4 БОЕ/мл. сигнал можно признать удовлетворительным, но при более низких концентрациях матрицы в результате ПЦР нарабатывается набор неспецифических продуктов, образующих характерный «шмер» на электрофореграмме.

Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными при работе с пробами комаров из Астраханской области. На рис.15 представлены результаты проведения гнездового и полугнездового вариантов ПЦР после анализа в агарозном геле.



А.



Б.

Рис 15. Сравнение гнездовой (А) и полу-гнездовой (Б) ПЦР тест-систем.

При сравнительном анализе электрофорезных гелей можно сделать вывод, что при использовании гнездовой (А) тест-системы значительно сокращается количество неспецифических продуктов амплификации, фрагменты получаются более четкими, что немаловажно при работе с такими объектами, как членистоногие. При анализе членистоногих переносчиков мы сталкиваемся с крайне низким содержанием вирусной РНК и большим количеством неспецифических продуктов амплификации.

4.4. Проверка работы ОТ-ПЦР тест-системы на различных генотипах ВЗН

Представляло интерес также проверить разработанную тест-систему на способность выявлять РНК всех четырех известных к моменту проведения работы генотипах ВЗН. (Рис. 16). Для проведения эксперимента использовали в качестве представителя первого генотипа ВЗН: LEIV-Vlg99-27889-human; второго генотипа вируса ЗН: LEIV-Ukr80-3266-rook; третьего генотипа ВЗН: Ig2266; четвертого генотипа вируса ЗН: Krnd88-190, титр вируса составлял 100 БОЕ/мл. Как следует из представленных данных, все четыре генотипа детектировались разработанной ОТ-ПЦР тест-системой.

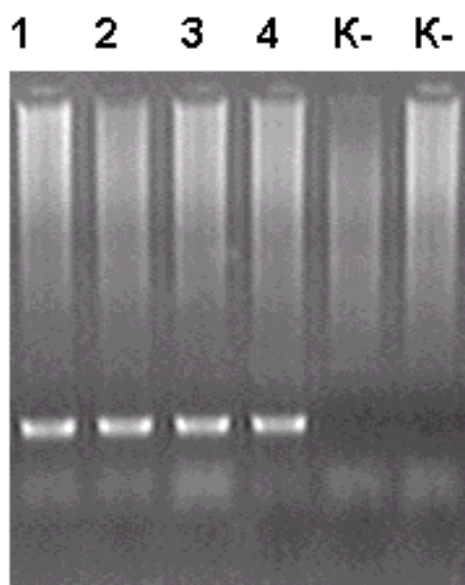


Рис. 16. Проверка тест-системы с четырьмя различными генотипами ВЗН. 1 - Vlg99-27889; 2 - Ukr80-3266; 3 - Ig2266; 4 - Krnd88-190.

Таким образом, на данном этапе работы была разработана высоко чувствительная ОТ-ПЦР тест-система для детекции всех четырех генотипов вируса Западного Нила. Определенная нами чувствительность системы как 50 БОЕ/мл является достаточной для исследований, связанных с детекцией ВЗН в биологических образцах. Вместе с этим, универсальность позволяют рассматривать разработанную тест-систему как методический инструмент, который может быть использован и в диагностических целях.

Как показали исследования вариантов ОТ-ПЦР (один раунд, «полугнездовой», «гнездовой») тест систем, наилучшим является

использование «гнездового» метода, который позволяет обнаружить РНК вируса ЗН до концентрации 50 БОЕ/мл. С учетом того, что объем пробы для выделения РНК составлял 200 мкл., и только половина выделенной РНК использовалась в реакции получения кДНК для дальнейшего проведения ПЦР, это означает, что порог чувствительности данного метода лежит около 5 копий на пробу.

Дополнительно, данная система показала возможность выявлять РНК ВЗН 1-го, 2-го, 4-го и 5-го генотипов. При анализе пулов комаров из Астраханской области, хотя основную часть (96%) положительных проб составляли ВЗН первого генотипа, были выявлены пробы, содержащие РНК вируса Западного Нила 2-го и 4-го генотипов (по 2% соответственно). Все ПЦР фрагменты, для которых была определена первичная нуклеотидная последовательность, содержали предполагаемый участок генома ВЗН, что говорит о высокой специфичности метода.

5. Исследование полевого материала

5.1. Исследование комаров и клещей Астраханской области на наличие ВЗН при помощи ОТ-ПЦР системы

Для определения наличия РНК вируса Западного Нила в пробах полевого материала, мы использовали ОТ-ПЦР тест систему. При получении положительного результата, мы считали, что в данном пуле комаров (100 комаров) находится одна особь, имеющая РНК ВЗН.

Таблица 7

Год сбора материала/ анализа материала	Кол-во особей	Кол-во «+» особей	Процент зараженности
2001/2002	19425 комаров	5 комаров	0,026%
2002/2003	77419 комаров 4563 клещей	34 комаров 49 клещей	0,043% 1,073%
2003/2004	113082 комары 2740 клещей	18 комаров 5 клещей	0,015% 0,18%
2004/2004 (перезимовавшие)	74547 комаров	36 комара	0,075%
ИТОГО:	289782 комаров 7303 клещей	93 комаров 54 клещи	0,032% 0,740%

5.2. Анализ зараженности видового состава комаров

Всего обследовано 285444 комара, принадлежащих к 7 различным видам, собранных как в диких, так и в антропогенных биоценозах. Т.к. все проанализированные пулы клещей включали в себя только один вид – *Hyalomma marginatum*, то оценка зараженности видового состава клещей не представляется возможной.

Таблица 8. Видовой состав и зараженность комаров за 2001-2004 гг

Название вида	Кол-во обследованных особей	Положительные	Процент зараженности, %
<i>Culex modestus</i>	22079	4	0,018
<i>Culex pipiens</i>	45057	16	0,035
<i>Anopheles messeae</i>	84227	27	0,032
<i>Anopheles hyrcanus</i>	63098	18	0,027
<i>Coquillettidia richiardii</i>	79787	26	0,033
<i>Aedes caspius</i>	920	1	0,11
<i>Aedes vexans</i>	700	0	0
<i>Culiseta annulata</i>	4	1	25,000
Всего	285444	93	0,033

При анализе вышеприведенных данных можно отметить, что уровень зараженности комаров различных видов является сравнимым (от 0,018% до 0,037%) и мы не можем утверждать о предпочтительности заражения ВЗН какого-либо вида.

Также необходимо отметить, что, из-за крайне небольшой выборки комаров видов *Aedes vexans* и *Aedes caspius*, мы не можем сделать достоверный вывод о реальной зараженности комаров этих видов. Можно только утверждать, что комары вида *Aedes caspius* также могут являться переносчиками ВЗН.

5.3. Анализ положительных проб для определения генотипа вируса при помощи определения частичной нуклеотидной последовательности

По данным частичного секвенирования 5'-концевой области генома положительные пробы и полученные штаммы, при обработке данных пакетом программ DNASTAR, были отнесены к первому, второму и четвертому генотипу ВЗН.

Для секвенирования использовали ПЦР – фрагмент ДНК, образующийся в результате +/- анализа проб комаров после второго раунда nested – ПЦР (фрагмент фланкирован праймерами 26F и 326R, и содержит участок генома ВЗН от 26 по 326 нуклеотид от 5'- конца). Для филогенетического анализа использовался несколько меньший фрагмент последовательности ДНК (последовательность без участков, соответствующих фланкирующим праймерам).

В качестве стандартных последовательностей для сравнения были использованы аналогичные участки штаммов из коллекции Института вирусологии им.Д.И.Ивановского. Штаммы первой группы ВЗН: Ast986, Vlg27889; второй группы ВЗН: 3266; третьей группы ВЗН: Ig2266; четвертой группы ВЗН: 190.

На основании полученных результатов с помощью программы DNASTAR был проведен филогенетический анализ данных последовательностей, который отражен в дендрограмме, приведенной ниже.

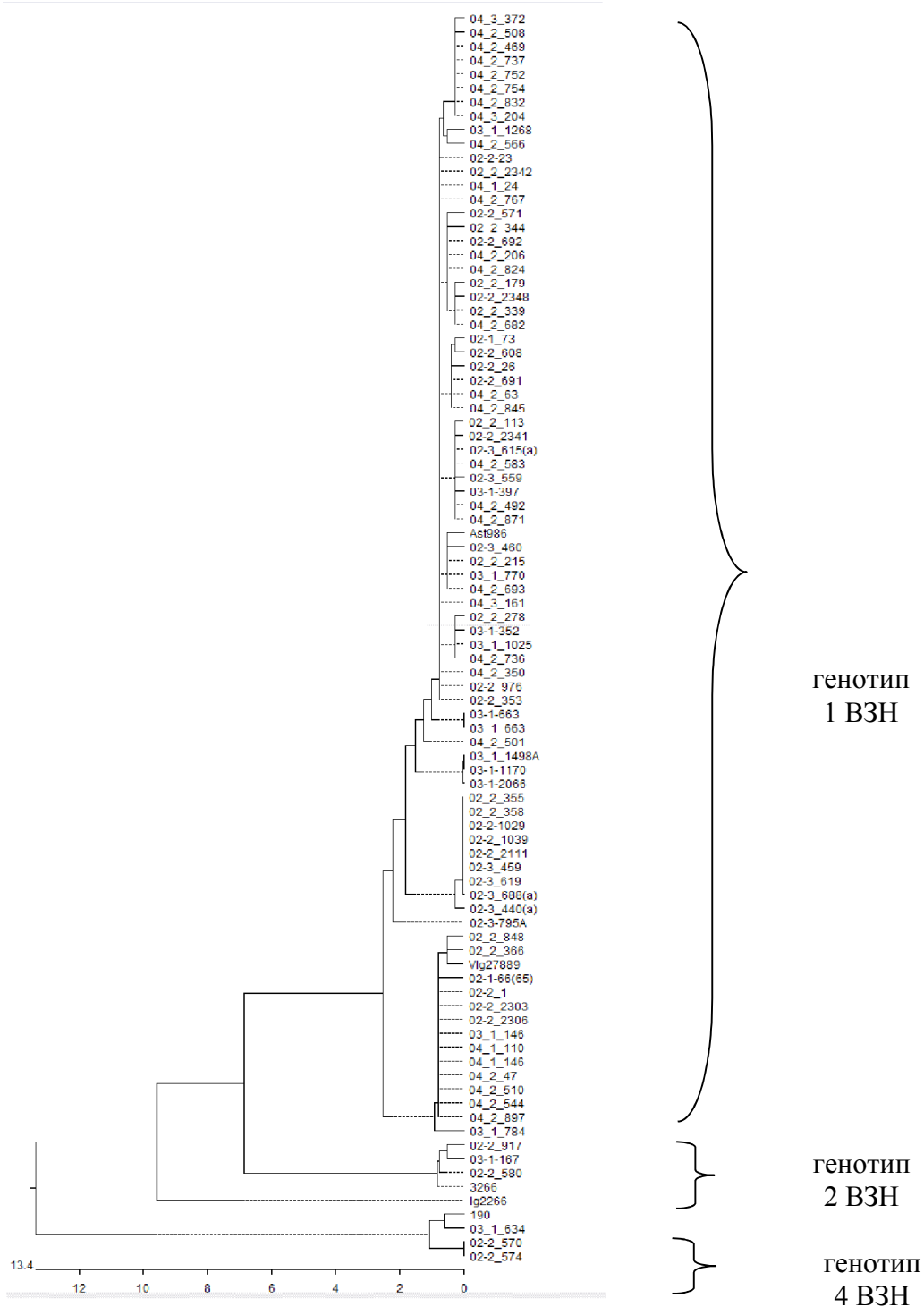


Рис 17. Дендрограмма, отражающая родство штаммов ВЗН, выделенных из полевого материала.

При проведении исследований была продемонстрирована способность выбранного варианта ОТ-ПЦР системы работать со сложными и высокозагрязненными пробами, содержащими РНК ВЗН в низкой концентрации

такими, как пулы комаров.

В результате проведенной работы по определению нуклеотидных последовательностей вируса ЛЗН из положительных пулов комаров можно сделать следующие замечания.

Во-первых, все положительные ПЦР – пробы содержали действительно фрагмент последовательности вируса ЛЗН и не являлись ложноположительными результатами ПЦР-анализа.

Во-вторых, практически все последовательности хотя бы минимально отличаются друг от друга, что указывает на их независимый первичный источник и отсутствие контаминации при проведении молекулярно-биологических манипуляций с материалом.

В-третьих, впервые показано на пробах полевого материала (пулы комаров) возможность разработанной ранее ОТ-ПЦР тест–системы выявлять наличие РНК вариантов ВЗН, относящихся ко второй и четвертой группам.

6. Клонирование кДНК-копии генома вируса Западного Нила

6.1. Получение плазмид, несущих кДНК-фрагменты вирусной РНК

Целью данной работы являлось клонирование полноразмерной кДНК копии генома вируса (в рамках работы по созданию обратной генетической системы для ВЗН). Для этой цели был выбран штамм LEIV-Krd88-190, изолированный на территории России в 1988 году из клеща *Dermacentor marginatus* и относящийся к отдельной, IV филогенетической группе.

6.2. Транскрипция РНК *in vitro*

Полученные плазмиды использовали для получения РНК *in vitro*. Для этого к линейаризованной по уникальному сайту *XhoI* плазмиде *pGEM-T7_3286* добавляли соответствующий фрагмент *XhoI-NotI* из плазмиды *pGEM-WN190int*. После лигирования лигазную смесь использовали в качестве матрицы в реакции транскрипции РНК *in vitro* (рис.18).

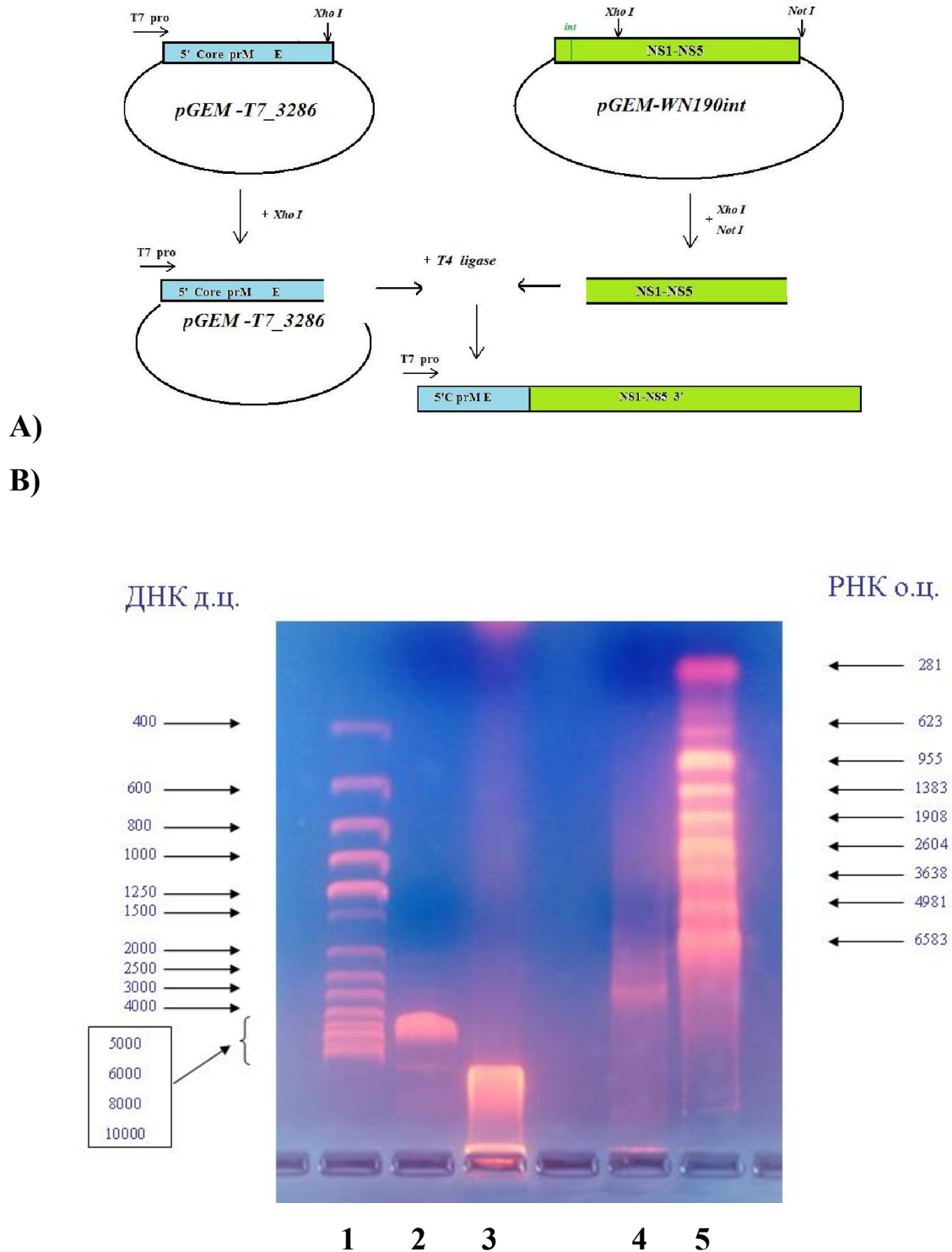


Рис.18. А) Схема транскрипции вирусной РНК *in vitro*. В) Электрофорез в 1% агарозном геле: 1. ДНК-маркер; 2. плаزمида *pGEM-T7_3286*; 3. плазмида *pGEM-WN190int*; 4. РНК-транскрипт ВЗН; 5. РНК-маркер.

Выбор штамма для проведения этой работы был сделан исходя из того, что, в отличие от генотипов 1 и 2, до настоящего времени не показана способность 4-го генотипа ВЗН вызывать заболевания у людей.

Распространение вирусов ЗН 5-го (индийского) генотипа до настоящего времени не показано на других территориях, кроме Индии, кроме того, исходя из последних данных, крайне высока вероятность 5-го генотипа вызывать эпидемические вспышки среди людей. Так как, работа по созданию полноразмерной копии генома ВЗН проводилась с расчетом на дальнейшее создание вакцинных штаммов, то данный выбор обоснован, хотя, к потенциальным минусам такого выбора следует отнести возможно, некоторые различия антигенных детерминант вирусов ВЗН разных генотипов

Выводы

1. Анализ первичной структуры 13 полных геномов вирусов Западного Нила, циркулировавших на территории Евразии в период с 1955 по 2000 гг. показал принадлежность этих штаммов к различным генотипам вируса Западного Нила и позволил установить различия в последовательностях, влияющих на патогенные свойства вируса. Получены новые знания о генетическом разнообразии ВЗН.
2. Показано, что из 31 штамма вируса Западного Нила, исследованного в работе путем полногеномного секвенирования, 28 принадлежат к субгенотипу 1а. Ранее данные штаммы были охарактеризованы только на основании антигенных свойств вирусов.
3. Штамм ВЗН 3266 (Украина, 1980 г.) принадлежит генотипу 2 и является первым охарактеризованным штаммом этого генотипа, выделенным на территории Евразии.
4. Получены новые знания, позволившие выявить новый генотип ВЗН. Установлено, что штамм Krnd88-190 (Россия, 1988 г.) вируса Западного Нила представляет новый генотип 4 и является для него топотипным штаммом.
5. Впервые установлено, что штамм Ig2266 (Индия, 1955 г.) вируса Западного Нила представляет новый генотип 5 и является для него топотипным штаммом. Получены новые знания, позволившие внести коррективы в существующую таксономию ВЗН.

6. Установлено, что 18 штаммов вируса Западного Нила, изолированных в 2001-2005 гг. в Астраханской области РФ, имеют высокую гомологию как между собой (99,6% - 99,9%), так и со штаммами ВЗН Ast99-901 и Ast99-986 (99,1% - 99,7%), которые вызвали эпидемические вспышки в этом регионе в 1999-2000 гг. Показано, что у 6 из 18 проанализированных штаммов присутствует потенциальный сайт N гликозилирования (NYS). У 9 из 18 штаммов сайт потенциального гликозилирования отсутствует (вместо мотива NYS присутствуют мотивы NYP, SYS, NYU и IYS), а у 3 штаммов содержится частично, так как соответствующая позиция в геноме гетерогенна. Представленные данные свидетельствуют об одновременной циркуляции различных по патогенности вариантов ВЗН в Астраханской области в 2002-2005 гг.
7. У исследованных в данной работе 18 штаммов вируса Западного Нила 2001-2005 гг. (Астраханская область РФ) в геликазном домене неструктурного белка NS3 в положении 249 содержится аминокислота пролин, что коррелирует с высокопатогенными свойствами вируса Западного Нила *in vivo*.
8. Разработанная ОТ-ПЦР тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет выявлять РНК вируса Западного Нила в биопробах птиц, комаров и клещей. Тест – система защищена патентом РФ №2199589 от 27.02.2003 г.
9. В Астраханской области в 2001-2004 гг. зараженность комаров вирусом Западного Нила составляла от 0,016% до 0,048%, преобладающим был субгенотип 1a (96%), на генотипы 2 и 4 приходилось по 2%.
10. Зараженность птиц вирусом Западного Нила в дельте Волги составляла 13,3 % и 9,6 % в 2001 и 2002 гг. соответственно. Зараженность птиц Волго – Ахтубинской поймы составляла в 2002 г. 3,3 %.
11. Разработана авторская экспериментальная система для транскрипции вирусной РНК *in vitro* на основе бактериальной высококопийной плазмиды, которая содержит полноразмерную кДНК копию генома штамма Krnd88-190,

и может быть использована для получения измененных вариантов вируса Западного Нила методом обратной генетики.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК

1. **Прилипов А.Г.**, Кинни Р.М., Самохвалов Е.И., Сэведж Г., Альховский С.В., Тсучия Р., Громашевский В.Л., Садыкова Г.К., Шаталов А., Вышемирский О., Усачев Е., Мохонов В., Воронина А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Жуков А., Ковтунов А., Гублер Д., Львов Д.К. Анализ новых вариантов вируса лихорадки Западного Нила // Вопросы вирусологии. 2002. №4. С. 36-41.
2. **Прилипов А.Г.**, Самохвалов Е.И., Львов Д.К., Громашевский В.Л., Бутенко А.М., Вышемирский О.И., Ларичев В.Ф., Гайдамович С.Я., Хуторецкая Н.В., Воронина А.Г., Новиков Д.В., Мохонов В.В., Альховский С.В. Генетический анализ вирусов лихорадки Западного Нила, выделенных на юге Русской равнины // Вопросы вирусологии. 2001. №1. С. 8-12.
3. Львов Д.К., Джаркенов А.Ф., Львов Д.Н., Аристова В.А., Ковтунов А.И., Громашевский В.Л., Вышемирский О.И., Галкина И.В., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., **Прилипов А.Г.**, Дерябин П.Г., Одолевский В.И., Ибрагимов Р.М. Изоляция вируса Западного Нила из *Phalacrocorax carbo*, *Corvus corone*, и клещей *Hyalomma marginatum* ассоциированных с ними в природных и синантропных биоценозах в дельте Волги (Астраханская область, 2001). // Вопросы вирусологии. 2002. №5. С. 7-12.
4. Альховский С.В., Львов Д.Н., Самохвалов Е.И. **Прилипов А. Г** и др. Обследование птиц дельты Волги (Астраханская область, 2001 г.) на наличие вируса лихорадки Западного Нила методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции // Вопросы вирусологии. 2003. №1. С. 14-17.
5. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю., Куликова Л.Н., Сэвидж Г., Чимидова Н.М., Михалеева Л.Б., Васильев А.В., Галкина И.В., **Прилипов А.Г.**, Кинни Р., Самохвалов Е.И., Бушкеева Б.Ц., Гублер Д., Альховский С.К., Аристова В.А., Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Москвина Т.М., Львов Д.Н., Злобина Л.В., Ляпина О.В., Садыкова Г.К., Шаталов А.Г., Усачев В.Е., Воронина А.Г., Лунева Л.И. Проблемы безопасности при новых и вновь возникающих инфекциях // Вестник РАМН. 2004. №5. С. 20-25.
6. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю., Куликова Л.Н., Сэвидж Г., Чимидова Н.М.,

Михаляева Л.Б., Васильев А.В., Галкина И.В., **Прилипов А.Г.**, Кинни Р., Самохвалов Е.И., Бушкиева Б.Ц., Гублер Д., Альховский С.К., Аристова В.А., Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Москвина Т.М., Львов Д.Н., Злобина Л.В., Ляпина О.В., Садыкова Г.К., Шаталов А.Г., Усачев В.Е., Воронина А.Г., Лунова Л.И. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000—2002 гг.) // Вопросы вирусологии. 2004. №3. С. 45-51.

7. Лаврентьев М.В., **Прилипов А.Г.**, Львов С.Д., Львов Д.К. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вируса Хатанга – нового представителя серокомплекса Калифорнийского энцефалита, изолированных в различных регионах Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2008. №6. С. 25-29.

8. Лаврентьев М.В., **Прилипов А.Г.**, Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М., Львов Д.К. Филогенетический анализ полной нуклеотидной последовательности генома вируса зайца-беляка // Вопросы вирусологии. 2008. №5. С. 31-36.

9. Поглазов А.Б., Шляпникова О.В., **Прилипов А. Г.** Характеристика нового генотипа вируса Хатанга. Вестник РАМН. 2011. №5. С. 45-9.

10. Гурьев Е.Л., Громашевский В.Л., **Прилипов А.Г.**, Львов С.Д. Анализ генома двух штаммов вируса Гета (LEIV 16275 Mar и LEIV 17741 MPR), изолированных из комаров в Северо-Восточной Азии. // Вопросы вирусологии. 2008. №5. С. 27-31.

11. Гурьев Е.Л., Громашевский В.Л., **Прилипов А.Г.**, Львов С.Д. Молекулярно-генетический анализ вариабельности штаммов вируса Гета, изолированных из комаров в Северо-Восточной Азии. // Вопросы вирусологии. 2008. №3. С. 9-12.

12. Ляпина О.В., Громашевский В.Л., **Прилипов А.Г.** Организация генома штамма Leiv-2247 Uz вируса Карши и его филогенетические взаимоотношения с другими представителями рода Flavivirus. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2006. №4. С. 35-40.

Статьи в рецензируемых международных журналах

13. Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L., Kovtunov A.I., **Prilipov A.G.**, Kinney R., Aristova V.A., Dzharkenov A.F., Samokhvalov E.I., Savage H.M., Shchelkanov M.Y., Galkina I.V., Deryabin P.G., Gubler D.J., Kulikova L.N., Alkhovsky S.K., Moskvina T.M., Zlobina L.V., Sadykova G.K., Shatalov A.G., Lvov D.N., Usachev V.E., Voronina A.G. West Nile virus and other zoonotic viruses

in Russia: examples of emerging-reemerging situations // Archives of Virology supplement. 2004. V.18. P. 85-96.

14. Razumov I.A., Kazachinskaia E.I., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Galkina I.V., Gromashevskii V.L., **Prilipov A.G.**, Kachko A.V., Ivanova A.V., L'vov D.K., Loktev V.B. Neutralizing monoclonal antibodies against Russian strain of the West Nile virus. *Viral Immunology*. 2005. V.18(3). P. 558-568.

Патенты

15. **Прилипов А.Г.**, Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Садыкова Г.К., Альховский С.В., Воронина А.Г. Патент на изобретение № 2199589 от 27.02.2003. Способ обнаружения вируса лихорадки Западного Нила.

Тезисы конференций, статьи в научных сборниках.

16. **Прилипов А.Г.**, Кинней Р.М., Самохвалов Е.И., Сэвадж Х.М., Альховский С.В., Цучай Р., Громашевский В.Л., Садыкова Г.К., Шаталов А.Г., Вышемирский О.И., Усачёв Е.В., Мохонов В.В., Воронина А.Г., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Ковтунов А.И., Жуков А.Н., Гублер Д.Дж., Львов Д.К. Генетический анализ вируса Западного Нила в Волгограде и Астрахани за 1999-2000 эпидемические сезоны. Тезисы II-ой Конференции по проблемам инфекционной патологии в Сибири, Дальнем Востоке и северных регионах азиатской части России (Новосибирск), 29–31 Мая, 2002. - С. 175.

17. Ляпина О.В., **Прилипов А.Г.**, Громашевский В.Л. Структура и анализ генома вируса Карши. Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006 г. С. 62-68.

18. Альховский С.В., **Прилипов А.Г.**, Самохвалов Е.И., Львов Д.К. Разработка ОТ-ПЦР тест-системы для детекции вируса Западного Нила и её апробация на полевом материале. Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006 г. С. 68-73.

19. **Прилипов А.Г.** Генотипы вируса Западного Нила. Учебно-методическое пособие для факультетов последипломного образования по специальностям: вирусология, инфекционные болезни, иммунология и эпидемиология. Изд. Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва 2014, С.61 -71.

Нуклеотидные последовательности полных геномов вируса ВЗН, депонированные в GenBank: JX041628.1, JX041629.1, JX041630.1, AF260968, JX041633.1, AY277252, AY278442, JX041634.1, AY278441, JX070655.1,

JX041631.1, JX041632.1, AY277251, DQ411029, DQ411030, DQ411031, DQ374653, DQ377178, DQ411032, DQ411033, DQ377180, DQ377179, DQ374651, DQ411034, DQ411035, DQ374650, DQ374652.

Благодарности

Автор приносит искреннюю благодарность всем своим коллегам, в тесном сотрудничестве с которыми была выполнена данная работа: сотрудникам лаборатории «Молекулярной генетики» за помощь в работе, всему коллективу лаборатории «Экологии вирусов» за предоставленный материал для исследований. Автор благодарен директору Института вирусологии им.Д.И. Ивановского, академику РАН Д.К.Львову за возможность проведения данных исследований и руководство в работе. Автор выражает огромную благодарность члену-корреспонденту РАН, профессору, д.м.н. Л.В. Урываеву и профессору, д.б.н. Т.В. Гребенниковой за неоценимую помощь в обсуждении работы и подготовке её к защите.