

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА, ВЫДЕЛЕННЫХ У РЕЦИПИЕНТОВ СОЛИДНЫХ ОРГАНОВ



О.Е. Ванькова, Н.Ф. Бруснигина

ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) остается одной из главных проблем современного здравоохранения. Она относится к категории социально и экономически значимых инфекций, поражает как детей, так и взрослых, характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и многообразием путей и факторов передачи. Серьезной проблемой является заражение цитомегаловирусом (ЦМВ) реципиентов крови и органов. Следует отметить, что несмотря на большую медицинскую и социальную значимость инфекции система эпидемиологического надзора и контроля за ЦМВИ в том виде, в котором она существует применительно к другим актуальным инфекциям, в РФ отсутствует. Цель исследования — провести поиск оптимальных вариантов генотипирования цитомегаловирусов и оценку генотипового разнообразия российских изолятов ЦМВ, выделенных у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов. В статье представлены результаты исследования образцов крови, лейкоцитарной массы, слюны, мочи и слезного отделяемого, взятых у 160 пациентов отделения трансплантологии Приволжского окружного медицинского центра ФМБА в возрасте от 22 до 64 лет, перенесших трансплантацию печени и почек. Для тестирования образцов применялись молекулярно-биологические и серологические методы. Генотипирование проводили путем NGS-секвенирования фрагментов ДНК ЦМВ. Установлена высокая частота выявления ДНК ЦМВ у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов. У 41,8±3,8% пациентов была обнаружена ДНК цитомегаловируса в образцах слюны и мочи, а у 18,1±3,04% из них — в образцах крови. У 98,8±3,2% пациентов диагноз «Цитомегаловирусная инфекция» был подтвержден серологически. По результатам анализа литературы проведена оценка различных методических подходов к генотипированию клинических изолятов ЦМВ. В результате был подобран и апробирован на клинических образцах вариант типирования, основанный на определении генотипов по двум вариабельным генам — *UL55 (gB)*, *UL73 (gN)*. Определены спектры и долевого распределение gB- и gN-генотипов ЦМВ, циркулирующих среди взрослых. Установлено, что в группе пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, преобладают генотипы gB2, gN4c, gN4a и gN1. В некоторых случаях обнаружена смешанная инфекция, обусловленная ассоциацией двух и трех генотипов ЦМВ. Проведенный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *UL55* и *UL73* свидетельствует о генетической гетерогенности российских изолятов ЦМВ, выделенных у взрослых пациентов группы риска.

Ключевые слова: цитомегаловирус, цитомегаловирусная инфекция, трансплантация солидных органов, генотипирование, частота встречаемости.

Адрес для переписки:

Ванькова Ольга Евгеньевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 920 022-63-80.
E-mail: voe0@mail.ru

Contacts:

Olga E. Vankova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, Blokhina Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 920 022-63-80.
E-mail: voe0@mail.ru

Для цитирования:

Ванькова О.Е., Бруснигина Н.Ф. Генотипирование клинических изолятов цитомегаловируса, выделенных у реципиентов солидных органов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 59–68. doi: 10.15789/2220-7619-GCC-1653

Citation:

Vankova O.E., Brusnigina N.F. Genotyping clinical cytomegalovirus isolates in solid-organs-transplant recipients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 59–68. doi: 10.15789/2220-7619-GCC-1653

GENOTYPING CLINICAL CYTOMEGALOVIRUS ISOLATES IN SOLID-ORGANS-TRANSPLANT RECIPIENTS

Vankova O.E., Brusnigina N.F.

Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Cytomegalovirus infection remains one of the leading problems in contemporary healthcare. It belongs to socially and economically significant infections with a high incidence both in children and adults, characterized by polymorphic clinical manifestations and a variety of routes and factors for infection transmission. CMV infection of blood and organ recipients is a serious problem. It should be noted that, despite the great medical and social significance, in the Russian Federation there is no system of CMV epidemiological surveillance and control as it was traditionally developed for other topical infections. The aim of this study is to search for optimal method of cytomegalovirus (CMV) genotyping and estimate genotypic diversity of CMV isolates in Russia for patients underwent solid organ transplantation. The research presents the data after examining blood samples, leukocytes, saliva, urine and lacrimal discharge collected from 160 patients at the Transplantation Department of the Privolzhsky District Medical Center of the FMBA, aged 22 to 64 years, after liver and kidney transplantation. Molecular biological and serological methods were used for testing. Genotyping was carried out by the NGS sequencing of CMV DNA fragments. A high prevalence of CMV was found in patients undergoing solid organ transplantation. For $41.8 \pm 3.8\%$ patients, cytomegalovirus DNA was detected in saliva and urine samples, and for $18.1 \pm 3.04\%$ of them — in blood samples. In $98.8 \pm 3.2\%$ of patients, the diagnosis of Cytomegalovirus infection (CMVI) was confirmed serologically. Based on a summary of reported data, estimation of various methodological approaches for genotyping of clinical CMV isolates was carried out. As a result, a typing option based on genotype determining for two variable genes *UL55 (gB)* and *UL73 (gN)* was selected. The spectra and proportional distribution of gB and gN CMV genotypes circulating among adults were determined. It was found that genotype prevalence in the group of patients who underwent solid organ transplantation was as follows: gB2, gN4c, gN4a, gN1. In some cases, a mixed infection was found due to the association of two and three CMV genotypes. The performed phylogenetic analysis of *UL55* and *UL73* gene nucleotide sequences indicates the genetic heterogeneity found for Russia-wide CMV isolates from in adult patients in the risk group.

Key words: *cytomegalovirus, cytomegalovirus infection, solid organ transplantation, genotyping, prevalence.*

Введение

Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) остается одной из главных проблем современного здравоохранения. Она относится к категории социально и экономически значимых инфекций, поражает как детей, так и взрослых и характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и многообразием путей и факторов передачи. Одной из областей с высоким риском поражения цитомегаловирусом (ЦМВ) является трансплантация органов, поскольку фактором передачи инфекции служит не только перелитая кровь, но и пересаживаемый орган. Пациенты, перенесшие трансплантацию органов, нуждаются в приеме иммуносупрессивных препаратов, что повышает риск инфицирования ЦМВ и развития инфекции. По данным литературы, частота выявления цитомегаловируса у пациентов, перенесших трансплантацию печени, варьирует от 23 до 85%, при этом у 15–40% из них развивается активная форма ЦМВИ [2, 9, 11].

Исследования зарубежных авторов свидетельствуют о том, что штаммы ЦМВ человека являются близкородственными. Гомология ДНК различных штаммов составляет 90–95%. Генетические различия среди ЦМВ-штаммов равномерно распределены по всему геному, но в отдельных регионах наблюдается высокий уровень мутаций. Эти области находятся

в строго определенных участках вирусного генома, что гарантирует существование четких геномных вариантов, или «генотипов» [4].

Полиморфные гены используются как эпидемиологический маркер при изучении циркуляции вируса в человеческой популяции [15]. В ряде работ показано, что геномные варианты ЦМВ-штаммов из различных географических регионов могут быть идентичными, существенно отличаются лишь показатели частоты их встречаемости [3]. Исследования, направленные на определение циркулирующих в Российской Федерации генотипов ЦМВ, необходимы как для получения объективной информации о региональных особенностях распространения, так и для решения различных задач эпидемиологического надзора за ЦМВИ, а также для оценки целесообразности применения разрабатываемых за рубежом вакцин.

Цель исследования — поиск оптимальных вариантов генотипирования цитомегаловирусов и оценка генотипового разнообразия клинических изолятов ЦМВ, выделенных у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы биологических субстратов (кровь, лейкоцитарная масса, слюна, моча, слезное отделяемое),

поступившие из отделения трансплантологии Приволжского окружного медицинского центра ФМБА от 160 пациентов, перенесших трансплантацию печени и почек. От всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании. Отбор и транспортировку клинического материала во ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной проводили сотрудники Приволжского окружного медицинского центра ФМБА России в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Детекцию ДНК ЦМВ осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением коммерческих диагностических тест-систем «АмплиСенс CMV-FL» производства ЦНИИЭ (Москва). Выделение ДНК проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ, Москва) в соответствии с инструкцией по применению. Чувствительность тест-систем согласно паспортным данным составляет 1000 вирионов в 1 мл образца.

Серологические исследования проводили с использованием наборов реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов классов G и M к ЦМВ производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск) ВектоЦМВ-IgG (ПУ № ФСР 2012/13834) и ВектоЦМВ-IgM (ПУ № ФСР 2012/13931).

Для генотипирования были отобраны 16 образцов ДНК ЦМВ от пациентов, перенесших трансплантацию органов. Секвенирование участков генома ЦМВ выполнено с применением технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе MiSeq (Illumina, США).

Концентрацию ДНК в образцах определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Австрия) с использованием набора Qubit DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Подготовку библиотеки ДНК для секвенирования осуществляли с использованием набора Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Оценку качества подготовленной библиотеки ДНК для секвенирования определяли с использованием флуориметра Qubit и автоматизированной системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced System (Qiagen, Германия), набора реагентов для быстрого разделения фрагментов ДНК QIAxcel DNA Fast Analysis Kit (3000) (Qiagen, Германия) и программного обеспечения QIAxcel ScreenGel (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов.

Выравнивание и сборку полученных коротких чтений относительно референс-генома осуществ-

ляли с использованием встроенного в секвенатор программного обеспечения. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали программу CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, США).

В качестве референс-последовательностей были выбраны последовательности генов *UL55 (gB)*, *UL73 (gN)* штаммов ЦМВ с известными геномами, взятыми из базы данных GenBank: GQ466044, HCU66425, HS5GLYBM, HS5GLYBL, HS5GLYBK, X04606, GQ221975, X17403, BK000394, FJ527563, HS5GLYBI, GQ121041, AY446894, M60929, HCU66425, GQ466044, EU686456, EU686440, AF309995, AF224677, AF390785, AF309993, AF309987, EU686430, AF390802, AF309986, AF309975, AF309974, AF310006, AF309988, AF309980, AF309975, AF309969, GU647095, GU441773, GU376726, GU376725, GU376724, GU376723, GU376721, GU376720. Визуализацию и анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения UGENE Unipro.

Анализ последовательности генов *UL55(gB)* и *UL73(gN)* ЦМВ проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы Clustal X 2.0 (<http://bips.ustrasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX>) [12].

Филогенетический анализ исследуемых нуклеотидных последовательностей генов и построение филогенетических деревьев проводили с использованием программного обеспечения MEGA 10.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакетов статистических программ Stata, Statistica 6.0.

Результаты

Результаты проведенного исследования показали высокую частоту выявления ЦМВ у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, в различных биологических субстратах. У 67 (41,8±3,8%) пациентов — реципиентов органов обнаружена ДНК цитомегаловируса в образцах слюны и мочи, а у 29 (18,1±3,04%) — в образцах крови. Следует отметить, что частота выявления ДНК ЦМВ у реципиентов почек была выше, чем у реципиентов печени (46,7±3,9 и 28,6±3,6% соответственно). При этом в 72,4±5,4% случаев из числа позитивных на ЦМВ была зарегистрирована клинически значимая концентрация (10⁵–10⁹ вирусных частиц/мл) ДНК ЦМВ в образцах лейкоцитарной массы. Гендерный анализ частоты обнаружения ЦМВ не выявил различий. Частота обнаружения ЦМВ в крови у мужчин после

пересадки органов составила 20,0%, а у женщин — 20,8%, в образцах слюны и мочи у мужчин — 44,0%, у женщин — 41,5%.

Диагностика ЦМВИ должна быть комплексной и включать как молекулярно-генетические методы индикации ЦМВ, так и серологические методы исследования. Диагноз ЦМВИ был подтвержден серологически: антитела класса G выявлены у 98,8±3,2% пациентов, перенесших пересадку солидных органов. Антитела класса M были выявлены у 12,2±3,4% пациентов, при этом ДНК ЦМВ обнаружена у 36,6±14% IgM-позитивных пациентов. Согласно данным литературы, ЦМВИ относится к инфекциям с нетипичной динамикой антителообразования, при которой наличие специфических IgM не является достоверным и достаточным признаком для определения стадии заболевания [22]. Для дифференциации первичной ин-

фекции и реинфекции (реактивации) принято использовать индекс avidности IgG в комплексе с другими серологическими маркерами ЦМВИ. В проведенном нами исследовании было показано, что все образцы являются высокоавидными. Низкоавидные анти-IgG были идентифицированы лишь в одном образце.

С целью поиска оптимального алгоритма генотипирования клинических изолятов ЦМВ был проведен анализ данных литературы. В результате были выбраны и апробированы на контрольном штамме ЦМВ AD169 несколько пар праймеров: для гена *UL55* — 14 пар, для гена *UL73* — 5 пар. Критериями отбора были соответствие праймеров анализируемой области гена, качество нарабатываемого фрагмента, оптимальная температура отжига праймеров, размер получаемого фрагмента. Характеристика последовательностей праймеров для генотипирования ЦМВ, опубликованных различными авторами, представлена в табл. 1.

Для проведения генотипирования ЦМВ по генам *UL55 (gB)* и *UL73 (gN)* были отобраны праймеры, предложенные Chou S. с соавт. в 1991 г. и Pignatelli S. с соавт. в 2003 г. соответственно [4, 18]. В табл. 2 представлен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, отобранных праймеров и 7 референс-штаммов ЦМВ, зарегистрированных в международной базе GenBank.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных для генотипирования ЦМВ

Table 1. Characterization of primers used for CMV genotyping

Последовательность праймеров Primer sequence	Источник Source
gB up1 5'-tggaactggaacggttggc-3' gB lo1 5'-gcacctgacgctggttgg-3' gB lo1a 5'-gaaacgcgcggcaatcgg-3'	[6]
gB up2 5'-gatctcctggatatacaggacg-3' gB lo2 5'-gaatygctgarggyttgatctg-3' gB up3 5'-acrttctgggaagcctcggaacg-3' gB lo3 5'-gagttcctgaagacctag-3'	[1]
gB up4 5'-cctcatcgctgctggatt-3' gB lo4 5'-tgactcccaccacatctc-3' gB up5 5'-atctggcccgcgacgaacat-3' gB lo5 5'-ctccgtacttgaggtagtg-3'	[21]
gBNF 5'-ggatctggtgctgtagtc-3' gBNR 5'-cgaataagatccgtaccctg-3' CLZ F 5'-tgttctggaaggtatcaagaa-3' CLZ R 5'-gtgaactgcagctggcgta-3'	[10]
gB1 forward 5'-tcaccattctctctacgac-3' gB1 reverse 5'-caccatggctgaccgttgg-3' gB2 forward 5'-cttaaggtacgggtctaccaa-3' gB2 reverse 5'-gaactgtagcattggcaaac-3' gB3 forward 5'-ccggtgtgaactccacg-3' gB3 reverse 5'-gattcgcttcargygacagg-3' gB4 forward 5'-tcgtgcaactctactcataatg-3' gB4 reverse 5'-cgttacgcgttgaggagat-3'	[7]
gB F 5'-tggaactggaacggttggc-3' gB R 5'-gcacctgacgctggttgg-3'	[4]
gN up 5'-tggtgtgatggagtgaac-3' gN lo 5'-tagccttgggtggttgc-3'	[13]
gN105672F 5'-cgcgacagtaccagttgaga-3' gN106306R 5'-ctacacctacgtcaccatc-3' gN105672F 5'-cgcgacagtaccagttgaga-3' gN106179R 5'-cttaccgccgggaacac-3'	[10]
gNF 5'-ttgggtcggtcaacatcgtaag-3' gNR 5'-ggtggttcagtaagttctgga-3'	[18]

Таблица 2. Сравнение отобранных праймеров для генов *UL55 (gB)* и *UL73 (gN)* с нуклеотидными последовательностями семи референсных штаммов ЦМВ

Table 2. Comparison between the selected primers for the genes *UL55 (gB)* and *UL73 (gN)* and the nucleotide sequences from 7 reference CMV strains

Праймер gB Primer gB	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
fix-bac	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
toledo	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
ad169	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
towne	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
merline	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
tr-bac	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
davis	tggaactggaacggttggc	gcacctgacgctggttgg
Праймер gN Primer gN	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
fix-bac	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
toledo	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
ad169	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
towne	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
merline	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
tr-bac	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta
davis	tggtgtgatggagtgaac	gcaaccaccaccaaggcta

На рис. 1 и 2 представлены результаты сравнения референсных нуклеотидных последовательностей ДНК фрагментов генов *UL55(gB)* и *UL73(gN)*. Отобранные участки генов характеризуются высоким уровнем варибельности, что позволяет разделить изоляты на генотипы, при этом в местах отжига праймеров количество замен минимально.

Анализ результатов секвенирования фрагментов гена *UL55* позволил выявить следующее распределение gB-генотипов ЦМВ, циркулирующих среди пациентов, перенесших пересадку солидных органов: gB2, gB1, gB3, gB4, при этом доминировал генотип gB2 (57%). У одного пациента была обнаружена инфекция, обусловленная

одновременным присутствием изолятов ЦМВ, принадлежащих к двум генотипам: gB3 и gB4.

Анализ результатов секвенирования фрагментов гена *UL73* клинических изолятов ЦМВ, выделенных у реципиентов солидных органов, позволил выявить следующие генотипы: gN4c, gN4a, gN1, gN4b, gN3b, при этом доминировали три генотипа — gN4c (38,4%), gN4a (23%) и gN1 (23%).

Следует отметить, что у некоторых пациентов была обнаружена ЦМВ-инфекция, обусловленная одновременным присутствием нескольких gN-генотипов ЦМВ. Так, у реципиентов печени определены ассоциации генотипов gN4c, gN4b и gN3b, gN4a и gN1, а у двух реципиентов почек — gN4c и gN1, gN4c и gN4a.

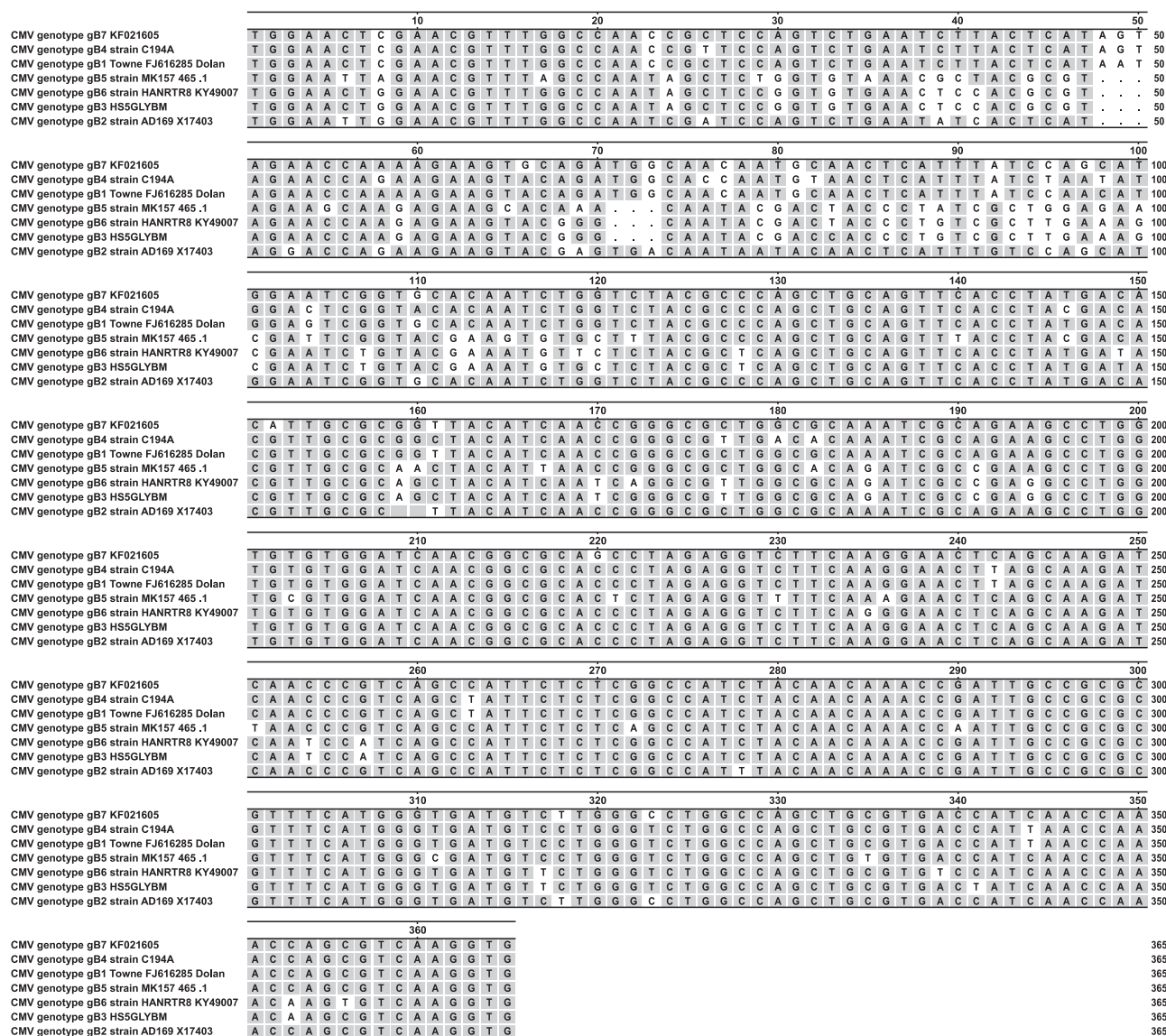


Рисунок 1. Сравнение референсных последовательностей ЦМВ разных генотипов gB в анализируемой области

Figure 1. Comparison of CMV reference sequences for diverse gB genotypes in the analyzed region

Примечание. Сравнение проведено с использованием пакета программ DNASTAR Lasergene 11 (США, 2018).
 Note. The comparison was carried out using the software package DNASTAR Lasergene 11 (USA, 2018).

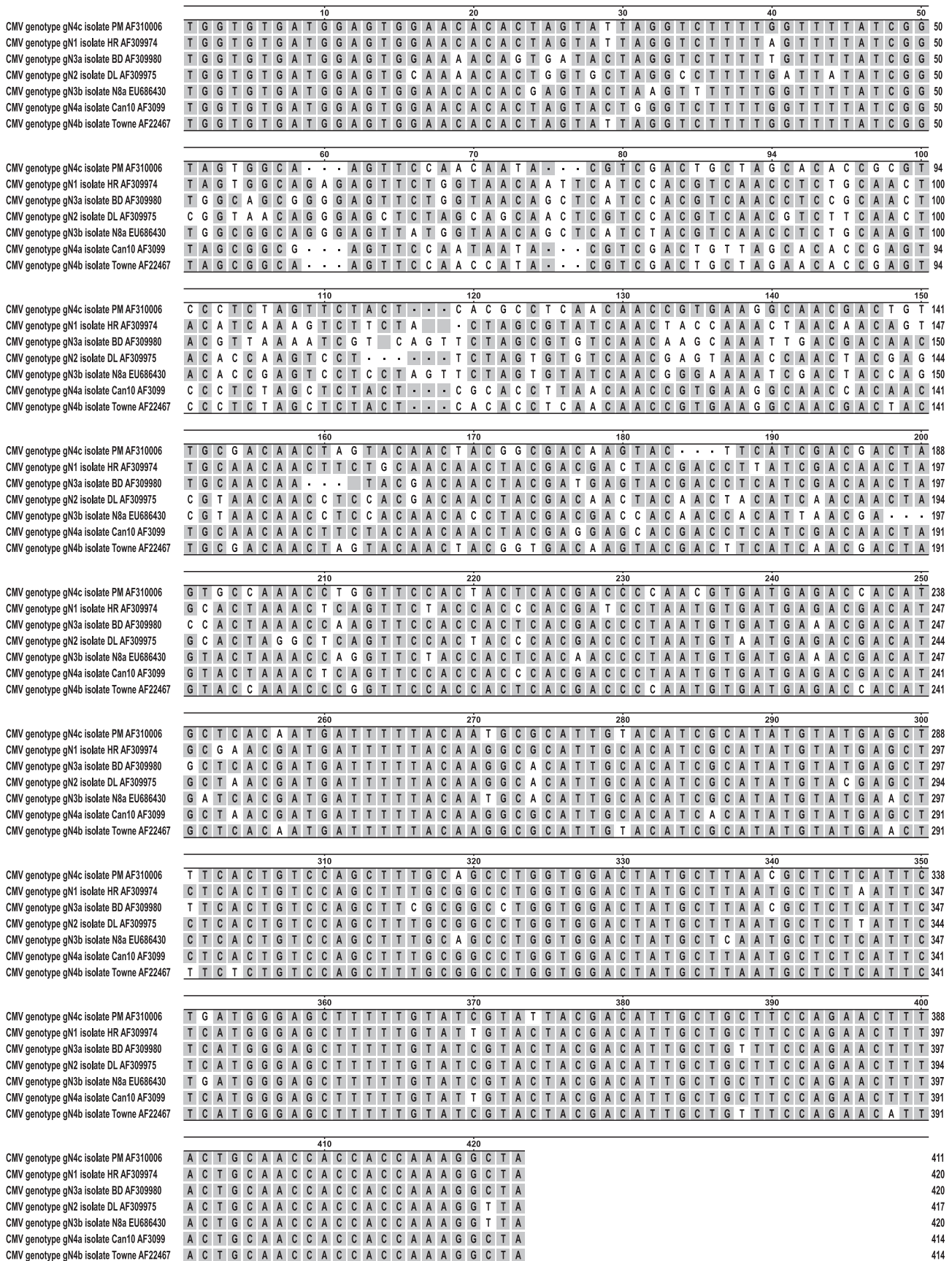


Рисунок 2. Сравнение референсных нуклеотидных последовательностей ЦМВ разных генотипов gN
 Figure 2. Comparison of CMV reference nucleotide sequences for diverse gN genotypes

Примечание. Сравнение проведено с использованием пакета программ DNASTAR Lasergene 11 (США, 2018).
 Note. The comparison was carried out using the software package DNASTAR Lasergene 11 (USA, 2018).

С целью определения эволюционного разнообразия исследуемых клинических изолятов ЦМВ, выделенных у реципиентов солидных органов, был проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *UL55* и *UL73*. Для сравнительного анализа из международной базы данных GenBank были отобраны нуклеотидные последовательности гена *UL55* (*gB*) 49-ти референс-штаммов и клинических изолятов, циркулирующих в разных странах Европы (Италии, Испании, Бельгии, Великобритании), США, Китае, Мексике, Индии, Египте, а также последовательности гена *UL73* (*gN*) 46-ти референс-штаммов и клинических изолятов, циркулирующих в странах Европы (Италии, Испании, Великобритании), США, Китае, Индии.

На рис. 3 представлены дендрограммы нуклеотидных последовательностей гена *UL55*

(*gB*) и гена *UL73* (*gN*) исследуемых и депонированных в базе данных GenBank/NCBI изолятов ЦМВ, выделенных у реципиентов солидных органов, построенные с использованием метода максимального правдоподобия.

Обсуждение

Проведенные исследования позволили выявить широкую распространенность цитомегаловирусной инфекции у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов. Так, ДНК ЦМВ была обнаружена у $46,7 \pm 3,9\%$ пациентов, перенесших пересадку почки, и у $28,6 \pm 3,6\%$ реципиентов печени, что согласуется с данными аналогичных исследований [9, 11, 16, 23]. Следует отметить, что уровень серопозитивности у подавляющего большинства реципиентов солидных органов был достоверно высоким

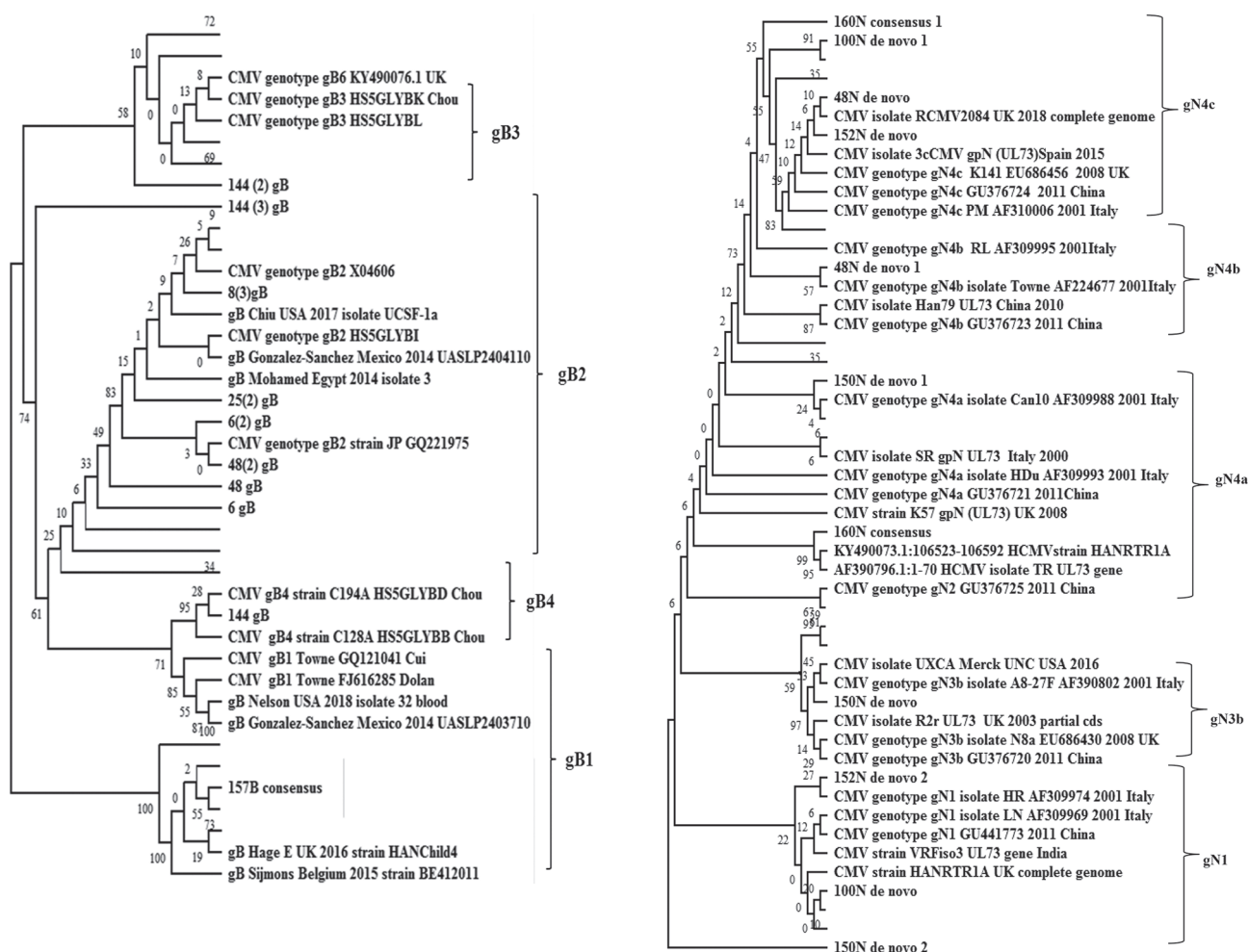


Рисунок 3. Дендрограммы нуклеотидных последовательностей генов *UL55* (*gB*) и *UL73* (*gN*) исследуемых и депонированных в базе данных GenBank/NCBI изолятов ЦМВ, построенные с использованием метода максимального правдоподобия

Figure 3. Phylogenetic analysis for the genes *UL55* (*gB*) and *UL73* (*gN*) from CMV isolates studied and deposited in the GenBank/NCBI database, the phylogenetic tree was constructed using Maximum Likelihood method

Примечание. Цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap. Note. The numbers in the tree nodes represent the support level obtained using the rapid bootstrap method.

и составил $98,8 \pm 3,2\%$ ($p \leq 0,05$). Антитела класса IgM были выявлены у $12,2 \pm 3,4\%$, при этом среди IgM-позитивных пациентов не у всех была обнаружена ДНК вируса. Установлено, что все IgG-антитела в исследуемых образцах от реципиентов органов являлись высокоавидными, и лишь у одного пациента были обнаружены низкоавидные IgG-антитела, что свидетельствовало о наличии у него первичной ЦМВИ.

В данном исследовании был проведен анализ различных подходов к типированию ДНК ЦМВ, предлагаемых в литературе. В результате нами был подобран и апробирован на клинических образцах вариант типирования ДНК ЦМВ, основанный на определении генотипов gB и gN. Сравнительный анализ частоты встречаемости этих генотипов в странах мира, включая Россию (по результатам наших собственных исследований), представлен в табл. 3.

В настоящее время в зарубежной литературе накоплено большое количество данных о распространенности различных геновариантов ЦМВ, циркулирующих у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов. В России работы по генотипированию ЦМВ до сих пор не проводились, исследования в основном были посвящены клиническим аспектам инфекции среди различных групп населения.

Полученные результаты позволили оценить генотиповую структуру популяции российских изолятов ЦМВ. Показано превалирование у пациентов, перенесших пересадку солидных ор-

ганов, четырех генотипов ЦМВ: gB2, gN4c, gN4a и gN1, что согласуется с данными литературы [5, 19]. Так, в исследовании Ciotti M. и соавт. (2017) установлено, что генотип gB2 доминировал у реципиентов органов, генотип gB4 присутствовал только при смешанных инфекциях, а у ВИЧ-инфицированных пациентов наиболее часто встречался генотип gB1 [5]. Доминирование генотипа gB2 у пациентов, перенесших пересадку костного мозга, было также показано в исследовании, проведенном в Бразилии [8].

Частота встречаемости инфекции, обусловленной одновременным присутствием ЦМВ разных генотипов, согласно полученным нами результатам варьировала от 13 до 25%. По данным литературы, показатели частоты встречаемости инфекции, обусловленной одновременным присутствием вирусов нескольких (двух и более) генотипов, варьируют от 6 до 59,6% в зависимости от величины выборки обследуемых пациентов. ЦМВ-инфекция, обусловленная вирусами двух разных генотипов, регистрируется у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного генеза (ВИЧ-инфицированные или пациенты, перенесшие пересадку органа), а также у новорожденных с врожденной ЦМВИ [9, 17].

Проведенный филогенетический анализ гена *UL55* (gB) показал, что изоляты ЦМВ, выделенные на территории Нижнего Новгорода, филогенетически располагаются ближе к штаммам, циркулировавшим на территории

Таблица 3. Частота встречаемости различных генотипов ЦМВ в разных странах мира

Table 3. Prevalence of various CMV genotypes in different countries of the world

Пациенты, перенесшие пересадку органов Organ transplant patients	Генотип Genotype	Частота встречаемости различных генотипов, % Genotypes prevalence, %	Страна Country
По данным литературы Published data	gB	gB3 (37,39%), gB1 (36,52%), gB5 (4,35%), gB2 (2,61%), gB4 (1,74%), mix (17,39%)	Китай [24] China
		gB1 (39%), gB2 (35%), gB4 (14%), gB3 (6%), mix (6%)	Бразилия [8] Brazil
		gB1 (30%), gB3 (26%), gB2 (17%), gB4 (4%), mix (17%)	Чехия [20] Czech Republic
		gB1 (26%), gB2 (10%), gB3 (10%), gB4 (5%), mix (49%)	Канада [14] Canada
		gB2 (23,4%), gB1 (12,8%), gB3 (4,2%), mix (59,6%)	Италия [5] Italy
	gN	gN3a (16,7%), gN4a (11,7%), gN2 (9,8%), gN1 (5,9%), gN4b (8,8%), gN3b (4,9%), gN4d (2,0%), mix (40,2%)	Китай [25] China
		gN4c (29,7%), gN1 (24,3%), gN4a (18,9%), gN4b (12,2%), gN2 (5,4%), gN3b (5,4%), gN3a (4,1%)	Италия [19] Italy
	gO	gO1 (39%), gO2 (20%), gO3, gO4	Чехия [17] Czech Republic
Результаты собственных исследований Own research results	gB	gB2 (50%), gB1 (13%), gB3 (12%), gB4 (12%), mix (13%)	Россия Russia
	gN	gN4c (67%), gN4a (25%), gN1 (25%), gN4b (17%), gN3b (17%), mix (18%)	

США в 2017–2018 гг. Следует отметить, что один нижегородский изолят ЦМВ с генотипом gB3 дивергировал в отдельную ветвь и филогенетически оказался ближе к штаммам ЦМВ, выделенным в Мексике в 2012 г. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *UL73 (gN)* показал, что нижегородские клинические изоляты ЦМВ характеризовались филогенетическим родством со штаммами, выделенными на территории различных стран: США, Италии, Испании, Великобритании, Китая в период с 2001 по 2018 г. Необходимо отметить, что нижегородские изоляты ЦМВ gN4a-генотипа дивергировали в отдельную ветвь, и они филогенетически ближе к штаммам ЦМВ, выделенным в Италии в 2001 г.

Согласно полученным данным, циркулирующие на территории России штаммы ЦМВ генотипов gB и gN филогенетически оказались ближе к штаммам, выделенным в странах Европы и США в период с 2001 по 2018 г. Следует отметить, что в настоящее время за рубежом активно проводится разработка вакцин против ЦМВ, некоторые из них находятся на стадии клинических испытаний. При создании эффективной вакцины следует учитывать наличие широкого спектра генотипов ЦМВ и региональные особенности их циркуляции. В этом плане исследования, направленные на изучение генетического разнообразия циркулирующих штаммов цитомегаловируса и их молекулярно-генетическую характеристику, а также разработку алгоритмов мониторинга групп риска по ЦМВИ, являются необходимыми для оценки целесообразности применения существующих и разрабатываемых новых вакцин.

Заключение

Таким образом, получен первый опыт генотипирования российских изолятов ЦМВ на примере Нижегородской области. Проведена оценка различных методических подходов к генотипированию клинических изолятов цитомегаловируса, выделенных от взрослых — реципиентов солидных органов. Выбраны и апробированы на контрольном штамме ЦМВ AD169 несколько пар праймеров: для гена *UL55 (gB)* — 14 пар, для гена *UL73 (gN)* — 5 пар. Определены спектры и долевого распределение gB- и gN-генотипов ЦМВ, циркулирующих среди взрослых в Нижнем Новгороде. Установлено, что в группе пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, преобладают генотипы gB2, gN4c, gN4a и gN1. В 25% случаев у пациентов группы риска обнаружена ЦМВИ, обусловленная ассоциацией двух и трех генотипов ЦМВ. Проведенный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *UL55* и *UL73* свидетельствует о генетической гетерогенности нижегородских изолятов ЦМВ.

Полученные данные о генотипах ЦМВ, циркулирующих в России и, в частности, на территории Нижегородского региона, позволяют расширить информационную и методическую базу для эпидемиологического надзора за ЦМВИ и внесут существенный вклад в решение проблемы целесообразности использования на территории России разрабатываемых за рубежом вакцин против этой инфекции. Международная база данных GenBank/EMBL/DBJ пополнена нуклеотидными последовательностями генома российских изолятов цитомегаловируса (мировой уровень внедрения).

Список литературы/References

1. Barbi M., Binda S., Caroppo S., Calvario A., Germinario C., Bozzi A., Tanzi M.L., Veronesi L., Mura I., Piana A., Solinas G., Pagni L., Evilaqua G., Mosca F. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J. Clin. Virol.*, 2001, vol. 21, no. 1, pp. 75–79. doi: 10.1016/S1386-6532(00)00188-8
2. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.*, 2010, vol. 20, no. 4, pp. 202–213. doi: 10.1002/rmv.655
3. Chen H.P., Lin J.C., Yang S.P., Lan Y.C., Weng W.S., Tsai C.H., Ho D.M., Liu C.Y., Cho W.L., Chan Y.J. The type-2 variant of human cytomegalovirus glycoprotein N (gN-2) is not the rarest in the Chinese population of Taiwan: influence of primer design. *J. Virol. Methods*, 2008, vol. 151, pp. 161–164. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.03.018
4. Chou S.W., Dennison K.M. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization related epitopes. *J. Infect. Dis.*, 1991, vol. 163, no. 6, pp. 1229–1234. doi: 10.1093/infdis/163.6.1229
5. Ciotti M., Cella E., Rittà M., Ciccozzi M., Cavallo R., Perno C.F., Costa C. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in Italian transplant patients. *Intervirology*, 2017, vol. 60, no. 4, pp. 165–170. doi: 10.1159/000486593
6. De Albuquerque D.M., Costa S.C. Genotyping of human cytomegalovirus using non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *J. Virol. Methods.*, 2003, vol. 9, no. 110 (1), pp. 25–28. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00094-6
7. De Vries J.J., Wessels E., Korver A.M., van der Eijk A.A., Rusman L.G., Kroes A.C., Vossen A.C. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 2, pp. 232–237. doi: 10.1128/JCM.05253-11
8. Dieamant D.C., Bonon S.H., Peres R.M., Costa C.R., Albuquerque D.M., Miranda E.C., Aranha F.J., Oliveira-Duarte G., Fernandes V.C., De Souza C.A., Costa S.C., Vigorito A.C. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect. Dis.*, 2013, vol. 10, no. 13: 310. doi: 10.1186/1471-2334-13-310
9. Görzer I., Guelly C., Trajanoski S., Puchhammer-Stöckl E. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 14, pp. 7195–7203. doi: 10.1128/JVI.00475-10

10. Grosjean J., Hantz S., Cotin S., Baclet M.C., Mengelle C., Trapes L., Virey B., Undreiner F., Brosset P., Pasquier C., Denis F., Alain S. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J. Clin. Virol.*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 43–48. doi: 10.1016/j.jcv.2009.08.018
11. Khalafkhany D., Makhdoomi K., Taghizadeh Afshari A., Motazakker M. Prevalence and genotype distribution of cytomegalovirus UL55 sequence in renal transplant recipients in north west of Iran. *J. Med. Virol.*, 2016, vol. 88, no. 9, pp. 1622–1627. doi: 10.1002/jmv.24509
12. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
13. Lisboa L.F., Tong Y., Kumar D., Pang X.L., Asberg A., Hartmann A., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Humar A. Analysis and clinical correlation of genetic variation in cytomegalovirus. *Transpl. Infect. Dis.*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 132–140. doi: 10.1111/j.1399-3062.2011.00685.x
14. Manuel O., Asberg A., Pang X., Rollag H., Emery V.C., Preiksaitis J.K., Kumar D., Pescovitz M.D., Bignamini A.A., Hartmann A., Jardine A.G., Humar A. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 49 (8), pp. 1160–1166. doi: 10.1086/605633
15. Murthy S., Hayward S., Wheelan S., Forman M.S., Ahn J.H., Pass R.F., Arav-Boger R. Detection of a single identical cytomegalovirus (CMV) strain in recently seroconverted young women. *PLoS One*, 2011, vol. 10, no. 6 (1), pp. 149–159. doi: 10.1371/journal.pone.001594
16. Navarro-Rodríguez V., Herrera-Munoz A., Castro A., Ramos-Esquivel A. Risk factors for cytomegalovirus disease in seropositive renal transplant recipients; a single-center case-controlled study. *J. Nephropathol.*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 240–247. doi: 10.15171/jnp.2017.39
17. Pignatelli S. Recent knowledge on the linkage of strain specific genotypes with clinical manifestations of human cytomegalovirus disease. *Recenti. Prog. Med.*, 2011, vol. 102, no. 1, pp. 5–10.
18. Pignatelli S., Dal Monte P. Epidemiology of human cytomegalovirus strains through comparison of methodological approaches to explore gN variants. *New Microbiol.*, 2009, vol. 32, no. 1, pp. 1–10.
19. Roubalova K. Genetic variability of cytomegalovirus glycoprotein O in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.*, 2011, vol. 13, no. 3, pp. 237–243. doi: 10.1111/j.1399-3062.2011.00625.x
20. Roubalová K.O., Strunecký S., Zúfanová S., Procházka B., Vitek A. Genotyping of viral glycoprotein B (gB) in hematopoietic stem cell transplant recipients with active cytomegalovirus infection: analysis of the impact of gB genotypes on the patients' outcome. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 92–99.
21. Shepp D.H., Match M.E., Lipson S.M., Pergolizzi R.G. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res. Virol.*, 1998, vol. 149, no. 2, pp. 109–114. doi: 10.1016/s0923-2516(98)80086-1
22. Torii Y., Yoshida S., Yanase Y., Mitsui T., Horiba K., Okumura T., Takeuchi S., Suzuki T., Kawada J.I., Kotani T., Yamashita M., Ito Y. Serological screening of immunoglobulin M and immunoglobulin G during pregnancy for predicting congenital cytomegalovirus infection. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2019, vol. 19, no. 1: 205. doi: 10.1186/s12884-019-2360-1
23. Varghese J., Subramanian S., Reddy M.S., Shanmugam N., Balajee G., Srinivasan V., Venkataraman J., Mohamed R. Seroprevalence of cytomegalovirus in donors and opportunistic viral infections in liver transplant recipients. *Indian J. Med. Res.*, 2017, vol. 145, no. 4, pp. 558–562.
24. Wu X.J., Wang Y., Zhu Z., Xu Y., He G., Han Y., Tang X., Fu Z., Qiu H., Sun A., Wu D. The correlation of cytomegalovirus gB genotype with viral DNA load and treatment time in patients with CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013, vol. 34, no. 2, pp. 109–112.
25. Xia C.S., Zhang Z. Analysis of human cytomegalovirus glycoprotein N genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. *Arch. Virol.*, 2011, vol. 156, no. 1, pp. 17–23. doi: 10.1007/s00705-010-0811-0

Авторы:

Ванькова О.Е., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Бруснигина Н.Ф., к.м.н., зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Vankova O.E., Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Brusnigina N.F., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.12.2020
Отправлена на доработку 31.10.2021
Принята к печати 25.12.2021

Received 15.12.2020
Revision received 31.10.2021
Accepted 25.12.2021