

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НИЖЕГОРОДСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР У ДЕТЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ И ЗДОРОВОМ ВИРУСОНОСИТЕЛЬСТВЕ



М.И. Попкова¹, О.В. Уткин¹, Д.А. Брызгалова¹, Н.А. Сахарнов¹, Е.А. Соболева²,
Е.А. Кулова³

¹ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

² ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия

³ ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», Нижний Новгород, Россия

Резюме. Многочисленные зарубежные исследования свидетельствуют о выраженной гетерогенности популяции вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), циркулирующего во всем мире. Предложены разные классификации ВЭБ. Внимание российских исследователей сконцентрировалось на изучении структурно-функционального полиморфизма онкогена *LMP-1* ВЭБ в контексте онкологических заболеваний у взрослых лиц. Целью работы явилась оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей с ВЭБ-инфекцией в Нижегородском регионе. Материалом исследования послужили лейкоциты крови и слюна детей в возрасте 1–17 лет с ВЭБ-инфекционным мононуклеозом ($n = 69$) и здоровых вирусоносителей сопоставимого пола и возраста ($n = 32$). Всего исследовано 178 изолятов ВЭБ. Для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Определение нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* выполнено методом секвенирования по Сэнгеру. Биоинформационный анализ данных проводили с помощью программного обеспечения MEGA X. В результате при ВЭБ-инфекционном мононуклеозе у всех детей был выявлен только тип ВЭБ-1, среди здоровых вирусоносителей ВЭБ-1 ($93,8 \pm 4,3\%$) и ВЭБ-2 ($6,2 \pm 4,3\%$). На основе классификации ВЭБ по R.H. Edwards и соавт. определена штаммовая принадлежность изолятов ВЭБ. Всего выявлено пять вариантов *LMP-1*, а именно *B95-8*, *China 1*, *Med-*, *NC* и *Alaskan*, среди которых доминировал *B95-8*. Варианты *LMP-1 Med+*, *China 2* и *China 3* не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов. Показано, что область тандемных повторов вносит существенный вклад в генетическое разнообразие популяции ВЭБ. Суммарно выявлено 100 аминокислотных замен, из которых наиболее распространенными в нижегородских изолятах ВЭБ являются G212S, S366T, E328Q и S309N. Сравнительный анализ показал, что штаммы, делеции, повторы, аминокислотные замены в изолятах ВЭБ из биологических образцов у детей с инфекционным мононуклеозом имели общие характеристики с группой здоровых виру-

Адрес для переписки:

Попкова Мария Игоревна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Contacts:

Mariia I. Popkova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office), +7 906 352-60-15 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Для цитирования:

Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А.,
Соболева Е.А., Кулова Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика
нижегородских изолятов вируса Эпштейна–Барр у детей при
инфекционном мононуклеозе и здоровом вирусоносительстве //
Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 275–288. doi: 10.15789/2220-
7619-MAG-2056

Citation:

Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A.,
Kulova E.A. Molecular and genetic characteristics of Nizhny Novgorod
region Epstein–Barr virus isolates in children with infectious mononucleosis
and healthy virus carriers // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 275–288. doi: 10.15789/2220-
7619-MAG-2056

© Попкова М.И. и соавт., 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MAG-2056>

соносителей. При активной форме ВЭБ-инфекции отмечено появление гетерогенных по структуре последовательностей ВЭБ, выделенных из лейкоцитов крови и слюны от одного источника. Таким образом, впервые проведена оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей при разных формах ВЭБ-инфекции, что является основой для перспективного развития клинических и эпидемиологических исследований ВЭБ-инфекции на новом методическом уровне.

Ключевые слова: разнообразие ВЭБ, ВЭБ-1, ВЭБ-2, LMP-1, штаммы, секвенирование, инфекционный мононуклеоз, дети.

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF NIZHNY NOVGOROD REGION EPSTEIN–BARR VIRUS ISOLATES IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS AND HEALTHY VIRUS CARRIERS

Popkova M.I.^a, Utkin O.V.^a, Bryzgalova D.A.^a, Sakharnov N.A.^a, Soboleva E.A.^b, Kulova E.A.^c

^a Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^c “Tonus Krokha i Semeynaya Stomatologiya” LLC, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Numerous foreign studies evidence about a pronounced heterogeneity of the Epstein-Barr virus (EBV) population circulating throughout the world. Various EBV classifications have been proposed. The attention of Russian researchers has focused on the study of the structural and functional polymorphism of the EBV *LMP-1* oncogene in the context of oncological diseases in adulthood. The aim of the work was to assess EBV molecular genetic diversity in children with EBV infection in the Nizhny Novgorod region. There were analyzed blood leukocyte and saliva specimens from children aged 1–17 years with EBV-infectious mononucleosis ($n = 69$) and sex- and age-matched healthy virus carriers of ($n = 32$). A total of 178 EBV isolates were studied. For differential detection of EBV-1/EBV-2, we used an optimized one-round PCR variant with electrophoretic detection of amplification products in agarose gel. Nucleotide sequences of the *LMP-1* gene C-terminal fragment were determined by Sanger sequencing. Bioinformatics data analysis was performed using MEGA X software. As a result, during EBV-infectious mononucleosis, only the EBV-1 type was detected in all children, among healthy virus carriers EBV-1 (93.8±4.3%) and EBV-2 (6.2±4.3%). Based on the EBV classification according to R.H. Edwards et al. the strain affiliation of EBV isolates was determined. A total of five variants of *LMP-1* were identified, namely *B95-8*, *China 1*, *Med-*, *NC* and *Alaskan*, among which *B95-8* dominated. The *LMP-1 Med+*, *China 2*, and *China 3* variants were not found in any of the studied samples. It has been shown that the region of tandem repeats makes a significant contribution to the genetic diversity of the EBV population. A total of 100 amino acid substitutions were identified, of which the most common in the Nizhny Novgorod region EBV isolates are G212S, S366T, E328Q and S309N. A comparative analysis showed that strains, deletions, repeats, amino acid substitutions in EBV isolates from biological samples in children with infectious mononucleosis had common characteristics with a group of healthy virus carriers. In the active form of EBV infection, the appearance of structurally heterogeneous EBV sequences isolated from blood leukocytes and saliva from a single source was noted. Thus, for the first time, the molecular genetic diversity of EBV in children with various forms of EBV infection was assessed, which is the basis for the prospective development of clinical and epidemiological studies of EBV infection at a new methodological level.

Key words: EBV diversity, EBV-1, EBV-2, LMP-1, strains, sequencing, infectious mononucleosis, children.

Введение

Согласно современной таксономии вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocryptoviruses*, виду *Human gamma-herpesvirus 4 (HHV4)*. Первая полногеномная последовательность ВЭБ (прототипный штамм *B95-8*) получена R. Ваггера и соавт. в 1984 г. (регистрационный номер GenBank: V01555) [14]. Многочисленные зарубежные исследования свидетельствуют о выраженной гетерогенности популяции ВЭБ, циркулирующего во всем

мире [2, 10, 12, 13, 16, 17, 23, 24, 31, 33, 37, 40, 41]. Предложено несколько классификаций на основе подхода «гена-кандидата» (*EBNA-2*, *EBNA-3*, *EBNA-1*, *LMP-1*, *BZLF1*, *BARF1*, *BART*, *EBERs* и др.)¹, широко изучена географическая распространенность отдельных геновариантов ВЭБ [23, 24, 34, 36]. К настоящему времени доказано существование специфических подтипов вируса с высокой онкогенностью при раке носоглотки (РНГ) в эндемичном районе Китая [25, 46]. С 2014 г. по настоящее время в GenBank представлено около 1000 полногеномных последовательностей ВЭБ [17, 42, 46].

¹ Сокращенное обозначение генов ВЭБ приведено согласно данным GenBank. URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term = Human+gammaherpesvirus+4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Human+gammaherpesvirus+4)

Реаннотирован референсный штамм ВЭБ дикого типа (*RefSeq HHV4*, регистрационный номер GenBank: NC_007605) [30, 36].

В России вопросу изучения генетического разнообразия ВЭБ посвящено ограниченное число публикаций (15 работ за последние 5 лет). Внимание исследователей сконцентрировано на изучении онкогена, кодирующего латентный мембранный белок 1 (*LMP-1*) [1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10]. Для характеристики генетического разнообразия ВЭБ используется преимущественно одна из нескольких классификаций, в основе которых лежит структурно-функциональный полиморфизм гена *LMP-1*. Объектом исследований является исключительно взрослое население в контексте изучения онкологических заболеваний или разных этнических групп. До сих пор ни одна из нуклеотидных последовательностей российских изолятов ВЭБ не была депонирована в базу данных GenBank.

Целью настоящего исследования явилась оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей с ВЭБ-инфекцией в Нижегородском регионе.

Материалы и методы

Характеристика групп исследования. Проведен молекулярно-генетический анализ 178 изолятов ВЭБ из лейкоцитов крови и слюны, полученных от 69 детей в возрасте 1–17 (медиана 5 [2; 10]) лет, находившихся на лечении в ГБУЗ НО «Детская инфекционная больница № 8 г. Нижнего Новгорода» с диагнозом «Инфекционный мононуклеоз ВЭБ-этиологии» (группа ВЭБ-ИМ), и 32 ребенка сопоставимого пола и возраста без клинических признаков данного заболевания, проходивших диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», г. Нижний Новгород (группа ВЭБ-ЗД). Работа выполнена с соблюдением этических требований. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских организаций. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

Сбор биологического материала. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная КЗЭДТА, и нестимулированная смешанная слюна (далее слюна). В работе использовались остаточные количества образцов цельной крови, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике.

Сбор биоматериала производили однократно: у пациентов с ИМ в первые 3–10 дней от начала клинических проявлений заболевания, а у здоровых волонтеров в день обследования.

Определение ДНК ВЭБ. Для получения фракции лейкоцитов периферической крови использовали реагент «Гемолитик» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Пробоподготовку слюны выполняли оптимизированным нами ранее способом [4]. Выделение тотальной нуклеиновой кислоты проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) с модификациями [4, 5]. Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови и слюне выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР-РВ соблюдали согласно инструкции производителя.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 методом ПЦР. Для раздельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) применен оптимизированный нами ранее вариант однораундовой ПЦР на основе гена EBNA-2 [4, 5].

ПЦР-анализ фрагмента гена LMP-1 ВЭБ. Положительные образцы, содержащие ДНК ВЭБ (по результатам ПЦР-РВ), были использованы для амплификации С-концевого фрагмента гена *LMP-1* вируса методом ПЦР. ПЦР-анализ проводили не в двухраундовой «полугнездовой» ПЦР, описанной в статье М.К. Smatti и соавт. [41], а в однораундовом варианте. При этом использовали праймеры, ранее предназначенные для первого раунда: A1 5'-AGT CAT AGT AGC TTA GCT GAA-3' и A2 5'-ССА TGG ACA ACG ACA CAG T-3' [41]. Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкМ в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный Taq Red буфер 12,5 мМ Mg²⁺ (Евроген, Россия); 5 е.а. Taq-F ДНК-полимеразы (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,1 мМ) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию. Условия амплификации: инициация 95°C — 15 мин, 40 циклов (95°C — 5 мин, 53°C — 1 мин, 72°C — 1 мин), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Амплификацию специфических фрагментов проводили на амплификаторе MaxyGene Gradient (Axugen, США). В результате амплифи-

Таблица 1. Распределение вариантов *LMP-1* ВЭБ по группам ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗДTable 1. Distribution of EBV *LMP-1* variants by EBV-IM (Infectious Mononucleosis) and EBV-HVC (Healthy Virus Carriers) groups

Группа сравнения Comparison group	Единицы измерения Units	Варианты <i>LMP-1</i> ВЭБ по классификации R.H. Edwards и соавт.* EBV <i>LMP-1</i> variants according to R.H. Edwards et al. classification*					
		<i>B95-8</i>	<i>China 1</i>	<i>Med-</i>	<i>NC</i>	<i>Alaskan</i>	Коинфекция Coinfection
ВЭБ-ИМ EBV-IM (n = 66)	абс./abs.	40	11	3	11	0	1**
	P±σр, %	60,6±6,0	16,7±4,6	4,5±2,5	16,7±4,6	0	1,5±1,5
ВЭБ-ЗД EBV-HVC (n = 31)	абс./abs.	13	3	6	8	1	0
	P±σр, %	41,9±8,9	9,7±5,3	19,4±7,1	25,8±7,9	3,2±3,2	0
Уровень значимости различий p-value		p = 0,085	p = 0,547	p = 0,049	p = 0,291	p = 0,711	p = 0,711

Примечание. *R.H. Edwards и соавт. 1999 [24]; ***China 1* в лейкоцитах крови и *B95-8* в слюне.Note. *R.H. Edwards et al. 1999 [24]; ***China 1* in blood leukocytes and *B95-8* in saliva.

цировали фрагмент С-концевой области гена *LMP-1* размером 602 п.н. [41].

Продукты ПЦР-амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). В качестве стандарта для определения длины двуцепочечных молекул ДНК был использован маркер длин фрагментов (М) «100+ bp DNA Ladder» (Евроген, Россия). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания). Полученные данные выражали в качественном формате — обнаружено или не обнаружено.

Секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ. Выделение и очистку полученных ампликонов *LMP-1* из агарозного геля проводили с помощью коммерческого набора «ФБиоГель» (Фрактал Био, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Конечный объем элюата составил 30 мкл. Концентрацию очищенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer plus (Eppendorf, Германия). В среднем количество ДНК составляло 150–300 нг на образец.

Для реакции мечения прямой и обратной последовательностей ДНК флуоресцентными терминальными нуклеотидами использовался набор «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Лабораторный протокол на всех этапах анализа соблюдали согласно инструкции производителя. Очистку меченой ДНК *LMP-1* от компонентов реакционной смеси проводили с использованием ацетата натрия (рН = 7,0) и изопропанола. Очищенный фрагмент элюировали в 20 мкл HiDi формамида (Applied Biosystems, США).

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК *LMP-1* осуществлялось на генетическом анализаторе AB-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием оригинального программного обеспечения 3500 Data Collection Software v. 1.0.

Биоинформационный анализ. Биоинформационный анализ данных проводился с помощью открытого программного обеспечения MEGA X (Mega Software, США)². Полученные исходные нуклеотидные последовательности выравнивались по алгоритму ClustalW. В качестве референсных последовательностей служили полученные из базы данных GenBank³ полногеномные последовательности прототипного штамма *B95-8* (V01555.2) и референсного штамма *HHV4* (NC_007605.1), а также нуклеотидные последовательности гена *LMP-1* — штаммы *China 1* (AY337723.1), *China 2* (AY337724.1), *Med-* (AY337721.2), *Med+* (AY337722.2), *NC* (AY337726.2), *Alaskan* (AY337725.1) и *CAO* (X58140.1). Нуклеотидные последовательности исследуемых изолятов ВЭБ и референтов транслировались в аминокислотные последовательности по стандартному генетическому коду. Построение филогенетических деревьев выполнено на основе метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Принадлежность исследуемых последовательностей *LMP-1* к определенным вариантам в рамках классификации R.H. Edwards и соавт. [24] устанавливалась по наличию сигнатурных аминокислотных замен (согласно табл. 1 в [24]).

Полученные нуклеотидные последовательности нижегородских изолятов ВЭБ депонированы в базе данных GenBank/NCBI от 09.08.2022 г. под регистрационными номерами OP105219–OP105376.

² URL: <https://www.megasoftware.net>³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполнен на основе языка программирования R версия 4.0.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)⁴ и среды RStudio версия 1.4.1106 (RStudio, PBC)⁵. При оценке распространенности ВЭБ-1/ВЭБ-2 и геновариантов *LMP-1* совпадающие результаты исследования изолятов ВЭБ, выделенных одновременно из лейкоцитов крови и слюны от одного источника вируса, из анализа исключались. Частоту показателя (долю) описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли ($P \pm \sigma$) в %. Оценку различий относительных показателей в анализируемых группах проводили с применением критерия χ^2 (хи-квадрат) с поправкой Йетса и критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2. По результатам ПЦР-анализа клинических изолятов ВЭБ тип вируса был идентифицирован у всех детей. При этом в группе ВЭБ-ИМ как в лейкоцитах крови, так и в слюне выявлялся только ВЭБ-1. В группе ВЭБ-ЗД доминирующим типом вируса также являлся ВЭБ-1 ($93,8 \pm 4,3\%$ (30/32)). Только у двух детей в лейкоцитах крови обнаружен ВЭБ-2, что составило $6,2 \pm 4,3\%$ от общего числа здоровых вирусоносителей. Случаев коинфекции двумя типами вируса не выявлено.

Оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ на основе метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена LMP-1. Предварительно проведенный сравнительный анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей двух референсных штаммов ВЭБ из базы данных GenBank — *B95-8* (V01555.2) и *RefSeq HHV4* (NC_007605.1) показал, что они являются идентичными друг другу в координатах нуклеотидной последовательности анализируемого нами участка гена *LMP-1* (168258–168320), что соответствует положению аминокислот 187–386 в белке *LMP-1*.

Дальнейшее субтипирование ВЭБ в нижегородских изолятах осуществлено на основе метода секвенирования по Сэнгеру самого варибельного участка генома ВЭБ, а именно фрагмента С-концевой области гена *LMP-1*. Из 178 изолятов ВЭБ было секвенировано 165 нуклеотидных последовательностей. Последующий анализ полученных аминокислотных последовательностей нижегородских изолятов ВЭБ проводили по нескольким направлениям: 1) дифференциальный анализ вариантов *LMP-1*

ВЭБ на основе классификации R.H. Edwards и соавт. [24]; 2) поиск делеций и вставок; 3) характеристика тандемных повторов; 4) аминокислотные замены.

В результате на основе общеизвестной и широко используемой классификации ВЭБ по R.H. Edwards и соавт. [24] дана оценка штаммовой принадлежности нижегородских изолятов ВЭБ. По итогам филогенетического анализа сформировались 5 клад, которые представляют 5 из 7 известных штаммов вируса, а именно *B95-8*, *China 1*, *Med*, *NC* и *Alaskan* (рис. 1). Отметим, что вариант *LMP-1 Med* был представлен исключительно *Med*– (не содержащий CAO-подобную делецию 30 н.о./10 а.к.). Варианты *LMP-1 Med+*, *China 2* и *China 3* не были идентифицированы ни в одном из нижегородских изолятов ВЭБ. Для подтверждения филогенетической группировки проверены сигнатурные аминокислотные замены, определенные авторами классификации в семи основных локусах *LMP-1* ВЭБ в позициях 229, 306, 312, 322, 334, 338, 344. При удалении локуса 344 и повторении анализа, как ранее было описано [24], дискриминация между штаммами сохранялась.

Данные табл. 1 демонстрируют, что какого-то конкретного штамма *LMP-1* ВЭБ, ассоциированного с ВЭБ-ИМ у детей, не существует. Однако доминирующее положение в нижегородских изолятах ВЭБ занял вариант *LMP-1 B95-8*, что отмечалось как при активной, так и латентной форме ВЭБ-инфекции. При сравнительной оценке в группе ВЭБ-ИМ варианты *B95-8* и *China 1* были выявлены в 1,4 и 1,7 раза чаще, чем в группе ВЭБ-ЗД (различия статистически незначимы), а вариант *Med*– встречался в 4,3 раза реже ($p = 0,049$). Установлен единственный случай коинфицирования разными вариантами *LMP-1*, когда у пациента с ВЭБ-ИМ одновременно были выявлены отличающиеся варианты вируса в слюне (*B95-8*) и лейкоцитах крови (*China 1*).

Осуществлен поиск делеций и вставок. Всего выявлено 4 варианта делеций: две из них, так называемые CAO-подобные делеции (30 н.о./10 а.к., охватывающая кодоны 246–355, и 15 н.о./5 а.к. в области повторяющихся повторов в положении 276–280), а две другие делеции выявлены впервые (6 н.о./2 а.к. в положениях аминокислот 215–216 и 63 н.о./21 а.к. в координатах 335–355). Общая частота делеций в группе детей с ВЭБ-ИМ составила $60,6 \pm 6,0\%$, а ВЭБ-ЗД — $77,4 \pm 7,5\%$ ($p = 0,162$) (табл. 2).

Все последовательности ДНК ВЭБ с делецией 30 н.о./10 а.к. были ассоциированы с вариантом *LMP-1 China 1*. Они выявлялись как в груп-

⁴ URL: <https://www.R-project.org>

⁵ URL: <http://www.rstudio.com>

пе ВЭБ-ИМ (18,2±4,7%), так и в группе ВЭБ-ЗД (9,7±5,3%). Различия данных показателей между группами были статистически незначимыми ($p = 0,433$). Делеция 6 н.о./2 а.к. обнаружена только в изолятах вируса, относящихся к варианту *LMP-1 Med-*, у одного пациента с ВЭБ-ИМ и одного здорового вирусоносителя. Единственным источником вируса (вариант *LMP-1 B95-8*), несущего делецию 63 н.о./21 а.к., являлся больной ребенок.

Проведен анализ числа и аминокислотного состава повторяющихся мотивов в области тандемных повторов С-концевого участка *LMP-1* (а.к. 253–306). Табл. 3 демонстрирует суще-

ственный вклад области тандемных повторов в генетическое разнообразие нижегородских изолятов ВЭБ. Полученные нами последовательности отличались по числу повторов, которое колебалось от 3 до 7, наличию делеции из 5 а.к., присутствию модифицированных повторяющихся мотивов и спектру аминокислотных замен в них. В половине (50,5±5,1%) анализируемых последовательностей был представлен прототипный вариант из 4,5 повторов, все они были ассоциированы исключительно с вариантом *LMP-1 B95-8*. В изолятах *China 1*, *NC*, *Med-* и *Alaskan* число повторов варьировало в установленном диапазоне, при этом мотив

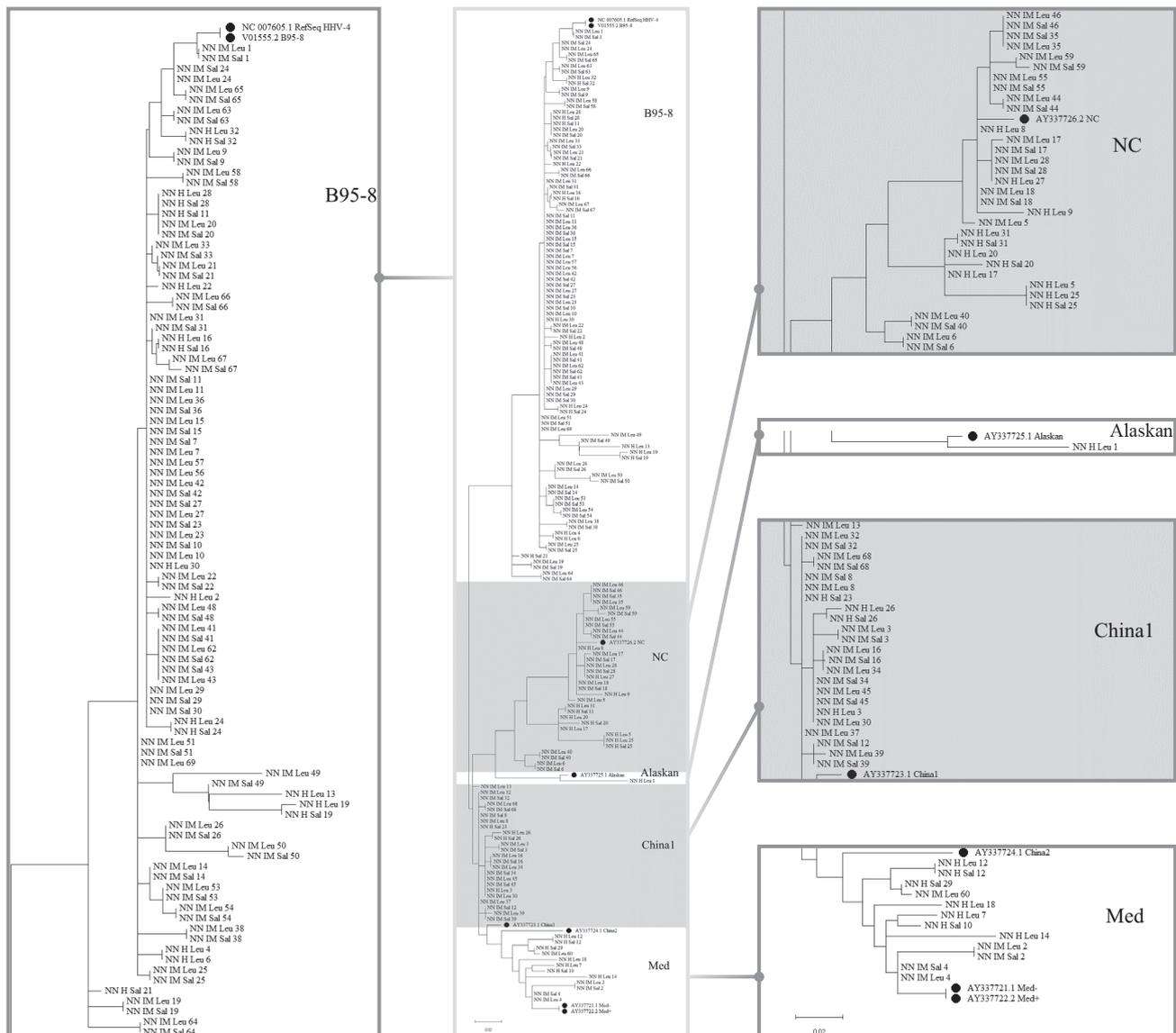


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения аминокислотных последовательностей С-концевого фрагмента *LMP-1*, принадлежащих 165 нижегородским изолятам ВЭБ, и 8 референсных последовательностей, полученных из базы данных GenBank/NCBI (метод максимального правдоподобия)

Figure. Phylogenetic tree constructed based on comparison of the amino acid sequences of the *LMP-1* C-terminal fragment from 165 EBV isolates in the Nizhny Novgorod region and 8 reference sequences obtained from the GenBank/NCBI database (Maximum Likelihood method)

Таблица 2. Делеции в С-концевой области *LMP-1* ВЭБ и частота их встречаемости в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗДTable 2. Deletions in the C-terminal region of EBV *LMP-1* and their frequency in the EBV-IM (Infectious Mononucleosis) and EBV-HVC (Healthy Virus Carriers) groups

Группа сравнения Comparison group	Единицы измерения Units	Делеции/Deletions					Всего Total	Без делеций Not deleted
		6 н.о./2 а.к. (а.к. 215–216) 6 nt./2 aa. (aa. 215–216)	15 н.о./5 а.к. (а.к. 276–280) 15 nt./5 aa. (aa. 276–280)	30 н.о./10 а.к. (а.к. 346–355) 30 nt./10 aa. (aa. 346–355)	63 н.о./21 а.к. (а.к. 335–355) 63 nt./21 aa. (aa. 335–355)			
ВЭБ-ИМ EBV-IM (n = 66)	абс./abs.	1	26	12	1	40	26	
	$P \pm \sigma$, %	1,5±1,5	39,4±6,0	18,2±4,7	1,5±1,5	60,6±6,0	39,4±6,0	
ВЭБ-ЗД EBV-HVC (n = 31)	абс./abs.	1	20	3	0	24	7	
	$P \pm \sigma$, %	3,2±3,2	64,5±8,6	9,7±5,3	0	77,4±7,5	22,6±7,5	
Уровень значимости различий p-value		p = 0,832	p = 0,021	p = 0,433	–	p = 0,162	p = 0,162	

из 5 а.к. между повторами из 11 а.к. во всех этих последовательностях отсутствовал.

Показано, что в любом варианте *LMP-1* (*B95-8*, *China 1*, *Med-* и *NC*) в области тандемных повторов могут быть обнаружены аминокислотные замены. Однако вариант *LMP-1 Med-* отличался наибольшей вариабельностью в области тандемных повторов. Практически каждая из 9 анализируемых последовательностей *Med-* была уникальной за счет комбинации разного числа повторов и расположения друг относительно друга повторяющихся прототипных и модифицированных последовательностей из 11 а.к. Модифицированные последовательности в варианте *Med-* характеризует замена аспарагиновой кислоты на глицин в третьем положении аминокислоты во втором — седьмом мотивах: D266G, D277G, D282G, D293G. Аминокислотные транзиции D282G, D293G также выявлялись в изоляте *LMP-1 Alaskan*. В мотиве PHDPL, завершающем область тандемных повторов, в отдельных последовательностях присутствовали штамм-характерные аминокислотные замены в положении 306 аминокислоты: в варианте *NC* — лейцина на глутамин L306Q (PHDPQ), в *Alaskan* — лейцина на пролин L306P (PHDPP).

Выявлено, что изоляты ВЭБ из разных компартментов (лейкоциты крови и слюна) от одного источника и отнесенные к одному варианту *LMP-1* могут быть гетерогенными по своей структуре за счет вариации в области тандемных повторов или по составу аминокислотных замен. Так, в изоляте из лейкоцитов крови ребенка с ВЭБ-ИМ (*China 1*) область тандемных повторов включала четыре прототипных и один модифицированный (D288G) мотив из 11 а.к., в то время как в последовательности белка вируса, выделенного из слюны, все пять были типичными.

Осуществлен поиск полного спектра аминокислотных замен в пределах анализируемого С-концевого фрагмента белка *LMP-1* с 187 по 386 а.к. Суммарно в нижегородских изолятах ВЭБ идентифицировано 100 мутаций аминокислот в 65 локусах (относительно референсной последовательности NC_007605.1). Последовательностей, идентичных дикому штамму ВЭБ, не выявлено. Минимальное число аминокислотных замен (две) обнаружено в единственном изоляте *LMP-1 B95-8*, а наиболее дивергентная последовательность (16 замен) характеризовала изолят *LMP-1 Med-*. Для наглядного сравнения степени дивергенции между вариантами *LMP-1* проведен расчет индекса, характеризующего среднее число аминокислотных замен, приходящихся на одну последовательность. Анализ выполнен дифференцировано в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД. Получены следующие значения индекса: *B95-8* — 3,9 и 4,1; *China 1* — 6,7 и 6,7; *Med-* — 12,0 и 12,3; *NC* — 11,5 и 11,3 соответственно. В единственном изоляте *Alaskan* содержалось 14 аминокислотных замен. Все выявленные замены по частоте распространения были объединены в три группы.

I группу составили наиболее распространенные в популяции ВЭБ Нижегородского региона 4 замены: G212S, S366T, E328Q и S309N. Замены G212S и S366T присутствовали во всех пяти выявленных вариантах *LMP-1*, их частота в группе ВЭБ-ИМ составила 95,5±2,1 и 97,0±2,1%, а в группе ВЭБ-ЗД — 100±0 и 83,9±6,6% соответственно. Замена серина на аспарагин в 309 позиции (S309N) присутствовала в составе всех анализируемых последовательностей вариантов *China 1*, *NC*, *Med-* и *Alaskan*. Аминокислотная транзиция E328Q выявлена только в изолятах *LMP-1 B95-8* в 100% последовательностей.

Во II группу включены аминокислотные замены с частотой 10–25% от общего числа изо-

Таблица 3. Характеристики числа и аминокислотного состава повторяющихся мотивов в С-концевой области LMP-1 ВЭБ
 Table 3. Characteristics of the number and amino acid composition of repeating motifs in the C-terminal region of EBV LMP-1

Штамм Strain	ВЭБ-ИМ EBV-IM (n = 66)	ВЭБ-ЗД EBV-HVC (n = 31)	Повторяющиеся мотивы в С-концевой области LMP-1 ВЭБ (а.к. 253–306) Repeated motifs in the C-terminal region of EBV LMP-1 (aa. 253–306)	Повторы Repeats
NC_007605.1 (RefSeq HHV4)	38/41	11/13	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4,5
	1/41	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4,5
B95-8	2/41	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4,5
	-	1/13	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	5,5
China 1	-	1/13	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4
	1/12	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4
Med-	9/12	2/3	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	3
	1/12	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	5
ALASKAN	1/12	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	5
	-	1/3	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	6
NC	-	1/3	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	7
	1/3	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	7
Med-	5/11	1/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	3
	-	1/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	3
NC	1/11	-	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - NG PQDPNTDDNG PHDPL	3,5
	3/11	3/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL	4
ALASKAN	-	1/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	4
	-	1/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	4
ALASKAN	2/11	1/8	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	5
	-	1/1	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	6
ALASKAN	-	1/1	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	5
	-	1/1	PQDPNTDDNG PQDPNTDDNG PHDPL - - - - - PQDPNTDDNG PHDPL	5

Примечание. PQDPNTDDNG — повторяющийся мотив из 11 а.к., PHDPL — повторяющийся мотив из 5 а.к., полужирным выделены аминокислотные замены.
 Note. PQDPNTDDNG - 11 aa. repeated motif; PHDPL — 5 aa. repeated motif; amino acid substitutions are in bold.

лятов. В их числе 10 сигнатурных аминокислотных замен в 6 основных локусах (S229T, L306Q, L306P, D312N, Q322E, Q322N, Q322T, Q334R, L338S, L338P), которые используются при дифференциальной оценке вариантов *LMP-1* по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. В эту группу вошли также дополнительные штамм-характерные мутации для *China 1* (E214Q), *NC* (D250N, S313P, G331Q, H352N, H358P) и *Med-* (замена аспарагиновой кислоты на глицин в третьем положении аминокислоты в повторяющемся мотиве из 11 а.к.: D266G, D282G, D293G и т.д.).

III группа представлена широким спектром аминокислотных замен, которые в нижегородских изолятах ВЭБ встречались спорадически (< 10%). Среди них D210A, G243A, G252A, D317Y, E326D, D349N, H352R, T361M, L364W, S366A, S367Y обнаруживали в единичных изолятах, отнесенных к разным вариантам *LMP-1*, независимо от формы ВЭБ-инфекции. Кроме того, замены E214Q, S229T, D250N, S309N, Q322T, Q334R, L338P, L338S встречались в нехарактерных штаммах. Отдельные аминокислотные замены выявлялись только в каком-то одном варианте *LMP-1*, при этом определенная часть из них не дублировала друг друга в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД:

– *B95-8*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — E328Q; ВЭБ-ИМ — A207P, D209H, D210Y, E214D, E214K, E214N, H225R, D298E, G315E, G351S, H352K, G354S, G355N, G355V, D356N, P357S, T361K; ВЭБ-ЗД — D210S, E214H, D216H, D216N, E221D, D285A, D288A, L323F, G331S, S350P, L359R, L364F;

– *China 1*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — Q322N; ВЭБ-ИМ — D288G;

– *Med-*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — D277G, D282G, D293G, Q322E, V327D, D333H; ВЭБ-ИМ — G246E, N289D, Q322D, Q334K, P337A; ВЭБ-ЗД — G222A, G222S, R223T, H225N, D266G, S311I, A314T, E328G, K330T, D333A, G335S, H348Y, G351A, D356P;

– *NC*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — L306Q, S313P, G331Q, H352N, H358P; ВЭБ-ИМ — G335D, P357Q, G368S; ВЭБ-ЗД — G243H, G260N, G331R;

– *Alaskan*: ВЭБ-ЗД — G232A, L306P, S309N, D312N, S313A, G331A, L338P, G353R, G345S, G354D, G355T.

Наиболее «горячими» точками замен стали аминокислоты в положениях 214 (пять), 322 и 331 (по четыре). Отметим, что относительно часто и только при ВЭБ-ИМ встречались транзиции D209H в изолятах *B95-8* (5/41) и G335D в изолятах *NC* (5/11).

Анализ изученных ранее другими исследователями аминокислотных замен в контексте так называемых САО-подобных мутаций (первый штамм, полученный от пациента с РНГ

в Китае) показал, что в нижегородских изолятах замены G212S и S366T имеются практически во всех установленных последовательностях, Q322N является уникальной заменой для штамма *China 1*, а Q334R, L338S — сигнатурные замены, характеризующие штаммы *China 1* и *Med-*. Такие транзиции, как Q189P, S192T и E328A, в анализируемых последовательностях обнаружены не были.

Обсуждение

К настоящему времени литературные данные, полученные разными исследовательскими группами, продемонстрировали высокую степень генетической гетерогенности ВЭБ, циркулирующего во всем мире [2, 10, 12, 13, 16, 17, 23, 33, 37, 40, 41]. Исторически первой классификацией ВЭБ и, как подтверждают современные работы, главным паттерном его генетического разнообразия является деление на два основных типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [22]. Однако на момент начала проведения настоящего исследования данные о типовой структуре вирусной популяции ВЭБ в РФ отсутствовали. В представленной работе оптимизированный нами ранее методический подход к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 [4, 5] позволил оценить распространенность разных типов вируса в детской популяции Нижегородского региона. Полученные данные о доминирующем положении ВЭБ-1 среди нижегородских изолятов соответствуют предыдущим оценкам распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди населения разных регионов мира.

Известно, что оба типа ВЭБ встречаются повсеместно. Однако ВЭБ-1 преобладает среди населения Европы, Северной и Южной Америки, Китая, Юго-Восточной Азии, Австралии [12, 16, 29, 31, 37, 41]. В то же время ВЭБ-2 считается характерным типом вируса, циркулирующим в регионе Африки к югу от Сахары и Папуа — Новой Гвинеи [18, 44]. Относительно небольшой процент представителей европеоидной расы инфицированы ВЭБ-2 [22]. Предполагается, что инфицирование ВЭБ-2 может происходить в условиях хронической иммунной активации, например, в тех частях Африки, где много сопутствующих инфекций, включая малярию, или у иммунокомпрометированных лиц [25, 44].

Основное фенотипическое различие между двумя типами вируса заключается в том, что ВЭБ-1 трансформирует В-лимфоциты человека более эффективно, чем ВЭБ-2 [18, 39]. Но недавние сообщения о том, что ВЭБ-2 инфицирует Т-клетки как в культуре, так и *in vivo* (например, у кенийских детей) определяют необходимость продолжения исследований биологического значения основных типов ВЭБ [20, 21]. Кроме

того, до настоящего времени имеется мало доказательств о связи заболеваний с определенным типом ВЭБ.

Ген *LMP-1* ВЭБ и кодируемый им одноименный белок многие десятилетия привлекали внимание ученых всего мира в связи с их выраженным структурно-функциональным полиморфизмом и высоким онкогенным потенциалом. В РФ за последние 20 лет были проведены исследования гена *LMP-1* ВЭБ в контексте изучения его особенностей в неэндемичном по ВЭБ-ассоциированным онкологическим заболеваниям регионе мира. Основная часть полученных к настоящему времени результатов российских исследователей была сгенерирована на основе применения методических подходов, включающих секвенирование по Сэнгеру, главным образом, С-концевой области гена *LMP-1* с последующей оценкой его геновариантов по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. При ВЭБ-ассоциированных онкологических заболеваниях среди представителей разных регионов России образцы *LMP-1* были отнесены к вариантам *B95-8*, *China 1*, *Med+* и *Med-* и *NC* [1, 3, 6]. Результаты исследований среди здорового населения свидетельствуют о том, что частота выявления геновариантов *LMP-1* в разных регионах и этнических группах на территории РФ существенно различается. Выявленные в российской популяции варианты *LMP-1* «вне варианта» классификации по R.H. Edwards и соавт. [24], а также вновь выявленные точечные мутации до сих пор остаются фенотипически не охарактеризованными [1, 3, 9, 10]. Сведения о проведении полногеномных исследований ВЭБ в России отсутствуют.

В нашем исследовании на основе метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена *LMP-1* проведено субтипирование полученных нижегородских изолятов ВЭБ от детей с разными формами ВЭБ-инфекции. Поскольку до настоящего времени другими исследователями вариабельность данного гена оценивалась с позиции изменений аминокислот, а не нуклеотидов, мы также обобщили полученные нами результаты на аминокислотном уровне (в координатах а.к. 187–386). Установлена штаммовая принадлежность нижегородских изолятов ВЭБ по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. В общем выявлено 5 из 7 известных вариантов *LMP-1*, а именно *B95-8*, *China 1*, *Med-*, *NC* и *Alaskan*. Результаты собственных исследований дополняют уже имеющиеся сведения о доминировании на территории Европейской части России прототипного варианта *LMP-1 B95-8* [1, 6, 10]. До сих пор варианты *LMP-1 China 2*, *China 3* и *Alaskan* среди россиян полностью отсутствовали [1, 3, 6, 7, 9]. Впервые в РФ нами обнаружен вариант *LMP-1 Alaskan*. Отметим, что изолят ВЭБ, в котором

он был идентифицирован, принадлежал к типу ВЭБ-2. При сравнительной оценке с данными других исследователей следует учитывать тот факт, что в Нижегородском регионе проживает многонациональное население, и нами впервые были обследованы дети с ВЭБ-инфекцией, а не взрослые.

К настоящему времени накоплены сравнительные данные о биологических свойствах вариантов *LMP-1*. В разных исследованиях было продемонстрировано, что варианты *CAO* [44], а также *Alaskan*, *China 1* и *Med+* повышают активность транскрипционного фактора NF-κB по сравнению с другими вариантами [32]. Особое внимание было сосредоточено на делеции в 30 н.о./10 а.к. (а.к. 346–355) [1, 27, 44]. Делетированный вариант продемонстрировал выраженную трансформирующую активность по сравнению с прототипным *B95-8* в фибробластах грызунов или эпителиальных клетках, имплантированных голым мышам [18], а также имел повышенный риск отдаленного метастазирования [35, 44]. В настоящее время установлено широкое распространение вариантов *LMP-1* с этой делецией как среди больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями, так и у здоровых носителей ВЭБ во всем мире. Результаты проведенного нами исследования подтверждают неспецифический характер данного полиморфизма для ИМ, но не исключают его влияния на выраженность клинических проявлений инфекции.

В половине нижегородских изолятов в области тандемных повторов выявлена делеция 5 а.к. между повторяющимися мотивами из 11 а.к., которую также относят к числу *CAO*-подобных [27]. Отметим, что интерпретация ее координат остается в разных исследовательских работах неоднозначной (а.к. 275–279 или а.к. 276–280) [7, 27]. В нашем исследовании впервые была обнаружена делеция 63 н.о./21 а.к. в координатах а.к. 335–355. В общем, обширные делеции 64 и 69 п.н, перекрывающие участок делеции из 10 а.к., выявляются, как правило, редко [8]. Считается, что они связаны со снижением активации фактора транскрипции AP-1 [41].

Продемонстрирована существенная вариабельность области тандемных повторов (а.к. 253–306). Известно, что последовательности референсных штаммов ВЭБ имеют четыре идеальных повтора, состоящих из 11 а.к. (PQDPDNTDDNG) с разрывом в 5 а.к. (PHDPL) между вторым и третьим повторами. Аналогичный мотив из 5 а.к. PHDPL является завершающим областью тандемных повторов (а.к. 302–306). Отметим, что при предоставлении результатов, характеризующих область тандемных повторов, одни группы исследователей используют вариант обозначения «4,5 повто-

ра» [16, 26], а другие описывают количество всех повторов из 11 а.к. и 5 а.к. по-отдельности [2, 3, 7, 10]. Поскольку последний фрагмент из 5 а.к. во всех последовательностях присутствует постоянно, мы склоняемся к трактованию результатов, основанному на принципе «4,5 повтора». Заслуживают внимания работы, в которых была выявлена статистически значимая связь числа повторов с заболеваниями. Так, аргентинские исследователи установили, что изоляты из ткани опухолей чаще содержат 5,5 повторов [26], а сербские ученые обнаружили, что повышение аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы у больных ИМ, всегда ассоциировано с вариантами ВЭБ с 3-мя или 4-мя повторами [16].

Аминокислотные замены G212S, Q322N, L338S и S366T по данным литературы сопряжены с CAO-подобными вариантами *LMP-1* (*China 1* и *Med*). Несмотря на то, что замена в 212 положении является штамм-характерной для *China 1*, *China 2*, *China 3* и *Alaskan* [24], в российских изолятах *LMP-1* до недавнего времени отмечалось ее полное отсутствие [1]. Лишь относительно недавно появились сообщения о ее выявлении на территории РФ [9]. Примечательно, что в основной части нижегородских изолятов ВЭБ была выявлена двойная замена G212S/S366T. Данное сочетание, как ранее было изучено, функционально ассоциировано с повышением уровня активации сигнального пути NF-κB и протеинкиназы-B (PKB/Akt) [1, 8]. По данным других исследователей любая из замен (G212S либо S366T) ассоциирована с усилением активации Erk и индукции экспрессии c-Fos [45], что влияет на процессы выживания, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток. По данным литературы у больных РНГ из России довольно часто наблюдали замену S366A [6], которая также была нами обнаружена в двух нижегородских изолятах у детей с ИМ (варианты *B95-8* и *China 1*).

Замена E328Q достаточно широко распространена среди жителей России [7, 11], встречается в изолятах ВЭБ от больных ИМ и РНГ в Сербии [15, 16]. Ее функциональную роль связывают со снижением цитотоксичности и усилением трансформирующей активности белка *LMP-1*. В нижегородских изолятах ВЭБ данная мутация ассоциирована исключительно с вариантом *LMP-1 B95-8* с частотой выявления 100%. Предполагается, что обнаруженные аминокислотные замены в 212, 328 и 366 положениях *LMP-1* придают этому онкобелку агрессивные характеристики и характерны для высокотуморогенных вариантов [7].

Остальная часть выявленных в настоящем исследовании мутаций остаются фенотипически не охарактеризованными. Можно предпо-

ложить, что они потенциально могут изменять профиль внутриклеточной активности ряда сигнальных путей и их биологические свойства [9]. Для выяснения роли каждого из них необходимо проведение экспериментальных работ *in vitro* и *in vivo*.

Как общая тенденция, при активной ВЭБ-инфекции (ИМ) отмечено появление гетерогенных по структуре последовательностей ВЭБ, выделенных из лейкоцитов крови и слюны от одного инфицированного лица. Отличающиеся геноварианты ВЭБ в одном биологическом образце, так называемые корезидентные варианты, в данном исследовании не были выявлены. По сложившимся представлениям гетерогенность *LMP-1* ВЭБ чаще возникает во время репликации вирусного генома в ротоглотке [38]. Отметим, что о множественных штаммах наиболее часто сообщается в работах, выполненных на основе гетеродуплексного анализа [40, 43].

Заключение

Применение оптимизированного варианта однораундовой ПЦР позволило оценить типовую структуру ВЭБ, циркулирующего среди детей в Нижегородском регионе. Во всех клинических изолятах, установленных от больных ВЭБ-ИМ, идентифицирован только ВЭБ-1, среди здоровых вирусоносителей доля ВЭБ-1 составила $93,8 \pm 4,3\%$, а ВЭБ-2 — $6,2 \pm 4,3\%$. Случаев коинфекции обоими типами вируса не выявлено.

С использованием метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена *LMP-1* получены новые данные о распространенности различных вариантов вируса при активной и латентной ВЭБ-инфекции у детей. Всего выявлено 5 вариантов *LMP-1: B95-8, China 1, Med-, NC* и *Alaskan*, среди которых доминировал геновариант *B95-8*. Вариант *Alaskan* в РФ выявлен впервые. Варианты *Med+*, *China 2* и *China 3* не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов.

Определено, что наиболее распространенными в нижегородских изолятах ВЭБ у детей являются 4 аминокислотные замены: G212S, S366T, E328Q и S309N, которые характеризуются высоким трансформирующим потенциалом инфицированных клеток преимущественно за счет активации сигнального пути NF-κB.

Сравнительный анализ показал, что штаммы, делеции, повторы, аминокислотные замены в изолятах ВЭБ из биологических образцов у детей с активной ВЭБ-инфекцией имели общие характеристики с группой здоровых вирусоносителей. Как общая тенденция, при активной форме ВЭБ-инфекции отмечено появление случаев несовпадающих штаммов и вариантов

ВЭБ между разными компартментами (лейкоциты крови и слюна) в организме одного инфицированного лица.

В целом оценка генетического разнообразия ВЭБ является основой для решения ключевого вопроса о потенциальной взаимосвязи разных геновариантов ВЭБ с особенностями

клинического течения ВЭБ-ассоциированных заболеваний, разработки средств их специфической профилактики и лечения, перспективного развития молекулярно-генетического мониторинга циркулирующих геновариантов вируса и совершенствования системы эпидемиологического надзора за ВЭБ-инфекцией.

Список литературы/References

1. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и у здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 2. С. 11–17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnov K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia, the infection of the population and the analysis of gene LMP1 variants at the patients with EBV-associated disease and at healthy patients. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 11–17. (In Russ.)]
2. Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 3. С. 246–257. [Gurtsevich V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V. Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, LMP1 oncogene variants, and malignancies. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 246–257. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-120
3. Гурцевич В.Э., Смирнова К.В., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Дубар Э., Сенюта Н.Б., Лихтенштейн А.В., Петров С.В. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в двух этнических группах России, татар и славян, и его влияние на развитие некоторых злокачественных опухолей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 347–358. [Gurtsevich V.E., Smirnova K.V., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Dubar E., Senyuta N.B., Lichtenstein A.V., Petrov S.V. Epstein–Barr virus LMP1 oncogene polymorphism in tatar and slavic populations in Russian Federation impacting on some malignant tumours. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 347–358. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EBV-1162
4. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Филатова Е.Н., Кулова Е.А. Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 461–474. [Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Filatova E.N., Kulova E.A. Methodological approaches to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 461–474. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1807
5. Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. [Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661
6. Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Дидук С.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34, № 2. С. 71–75. [Senyuta N.B., Smirnova K.V., Diduk S.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with the Epstein–Barr virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2016, vol. 34, no. 2, pp. 71–75. (In Russ.)] doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75
7. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247
8. Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э. Молекулярно-биологические свойства гена lmp1 вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 3. С. 5–13. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Senyuta N.B., Gurtsevich V.E. Molecular biological properties of the Epstein–Barr virus LMP1 gene: structure, function and polymorphism. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 5–13. (In Russ.)]
9. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Фроловская А.А., Петров С.В., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1 // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5, № 3. С. 65–74. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., Petrov S.V., Lichtenstein A.V., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2018, vol. 5, no. 3, pp. 65–74. (In Russ.)] doi: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74

10. Смирнова К.В., Сеньюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86
11. Яковлева Л.С., Сеньюта Н.Б., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Варианты онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в клеточных линиях различного происхождения // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 5. С. 800–810. [Yakovleva L.S., Senyuta N.B., Goncharova E.V., Scherback L.N., Smirnova R.V., Pavlish O.A. Gurtsevich V.E. Epstein–Barr Virus LMP1 oncogene variants in cell lines of different origin. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, vol. 49, no. 5, pp. 800–810. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0026898415050213
12. Ai J.H., Xie Z.D., Liu C.Y., Gao L.W., Yan J. [Characteristic of nuclear antigen 1 gene and latent membrane protein 1 gene of Epstein–Barr virus in primary EBV infection in children in Beijing area in 2005–2010]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2012, vol. 26, no. 5, pp. 352–355. (In Chin.)
13. Arturo-Terranova D., Giraldo-Ocampo S., Castillo A. Molecular characterization of Epstein–Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia. *Biomedica*, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 76–88. doi: 10.7705/biomedica.4917
14. Baer R., Bankier A.T., Biggin M.D., Deininger P.L., Farrell P.J., Gibson T.G. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. *Nature (London)*, 1984, vol. 310, pp. 207–211. doi: 10.1038/310207a0
15. Banko A.V., Lazarevic I.B., Folic M.M., Djukic V.B., Cirkovic A.M., Karalic D.Z., Cupic M.D., Jovanovic T.P. Characterization of the variability of Epstein–Barr virus genes in nasopharyngeal biopsies: potential predictors for carcinoma progression. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4: e0153498. doi: 10.1371/journal.pone.0153498
16. Banko A.V., Lazarevic I.B., Stevanovic G., Cirkovic A., Karalic D., Cupic M., Banko B., Milovanovic J., Jovanovic T. Analysis of the variability of Epstein–Barr virus genes in infectious mononucleosis: investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement. *J. Med. Biochem.*, 2016, vol. 35, no. 3, pp. 337–346. doi: 10.1515/jomb-2015-0021
17. Blazquez A.C., Berenstein A.J., Torres C., Izquierdo A., Lezama C., Moscatelli G., De Matteo E.N., Lorenzetti M.A., Preciado M.V. Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein–Barr virus genomes from argentina and other geographies. *Virus*, 2021, vol. 13, no. 6: 1172. doi: 10.3390/v13061172
18. Bridges R., Correia S., Wegner F., Venturini C., Palser A., White R.E., Kellam P., Breuer J., Farrell P.J. Essential role of inverted repeat in Epstein–Barr virus IR-1 in B cell transformation; geographical variation of the viral genome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2019, vol. 374, no. 1773: 20180299. doi: 10.1098/rstb.2018.0299
19. Bristol J.A., Djavadian R., Albright E.R., Coleman C.B., Ohashi M., Hayes M., Romero-Masters J.C., Barlow E.A., Farrell P.J., Rochford R., Kalejta R.F., Johannsen E.C., Kenney S.C. A cancer-associated Epstein–Barr virus BZLF1 promoter variant enhances lytic infection. *PLoS Pathog.*, 2018, vol. 14, no. 7: e1007179. doi: 10.1371/journal.ppat.1007179
20. Coleman C.B., Daud I.I., Ogolla S.O., Ritchie J.A., Smith N.A., Sumba P.O., Dent A.E., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells in healthy kenyan children. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 6, pp. 670–677. doi: 10.1093/infdis/jix363
21. Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., Haverkos B., Pelanda R., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells and induces B cell lymphomagenesis in humanized mice. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 21: e00813-18. doi: 10.1128/JVI.00813-18
22. Correia S., Palser A., Elgueta Karstegl C., Middeldorp J.M., Ramayanti O., Cohen J.I., Hildesheim A., Fellner M.D., Wiels J., White R.E., Kellam P., Farrell P.J. Natural variation of Epstein–Barr virus genes, proteins, and primary microRNA. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 15: e00375-17. doi: 10.1128/JVI.00375-17
23. Corvalán A.H., Ruedlinger J., de Mayo T., Polakovicova I., Gonzalez-Hormazabal P., Aguayo F. The phylogeographic diversity of EBV and admixed ancestry in the americas — another model of disrupted human-pathogen co-evolution. *Cancers (Basel)*, 2019, vol. 11, no. 2, pp. 217. doi: 10.3390/cancers11020217
24. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology*, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855
25. Farrell P.J., White R.E. Do Epstein–Barr virus mutations and natural genome sequence variations contribute to disease? *Biomolecules*, 2022, vol. 12, no. 1: 17. doi: 10.3390/biom12010017
26. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein–Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 3: e0174221. doi: 10.1371/journal.pone.0174221
27. Hu L.-F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.-L., Ernberg I., Klein G., Winberg G. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, pt. 1, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399
28. Hui K.F., Chan T.F., Yang W., Shen J.J., Lam K.P., Kwok H., Sham P.C., Tsao S.W., Kwong D.L., Lung M.L., Chiang A.K.S. High risk Epstein–Barr virus variants characterized by distinct polymorphisms in the EBER locus are strongly associated with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2019, vol. 144, no. 12, pp. 3031–3042. doi: 10.1002/ijc.32049
29. Ikuta K., Satoh Y., Hoshikawa Y., Sairenji T. Detection of Epstein–Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect.*, 2000, vol. 2, no. 2, pp. 115–120. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00277-x
30. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein–Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.*, 2019, vol. 110, no. 4, pp. 1132–1139. doi: 10.1111/cas.13954
31. Lay M.L., Lucas R.M., Toi C., Ratnamohan M., Ponsonby A.L., Dwyer D.E. Epstein–Barr virus genotypes and strains in central nervous system demyelinating disease and Epstein–Barr virus-related illnesses in Australia. *Intervirology*, 2012, vol. 55, no. 5, pp. 372–379. doi: 10.1159/000334693
32. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 13, pp. 6458–6468. doi: 10.1128/JVI.00135-06

33. Monteiro T.A.F., Costa I.B., Costa I.B., Corrêa T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S., Ramos F.L.P., Filho A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 24, no. 4, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004
34. Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein–Barr virus strains and variations: geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.*, 2017, vol. 89, no. 3, pp. 373–387. doi: 10.1002/jmv.24633
35. Pai P.C., Tseng C.K., Chuang C.C., Wei K.C., Hao S.P., Hsueh C., Chang K.P., Tsang N.M. Polymorphism of C-terminal activation region 2 of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 in predicting distant failure and post-metastatic survival in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, 2007, vol. 29, pp. 109–119. doi: 10.1002/hed.20483
36. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237. doi: 10.1128/JVI.03614-14
37. Polz D., Podsiadło Ł., Stec A., Polz-Dacewicz M. Prevalence of EBV genotypes in Polish, Taiwanese and Arabic healthy students and association between genotypes and 30-bp deletion in the LMP-1 gene phylogenetic analysis. *Pol. J. Microbiol.*, 2014, vol. 63, no. 1, pp. 105–109.
38. Renzette N., Somasundaran M., Brewster F., Coderre J., Weiss E.R., McManus M., Greenough T., Tabak B., Garber M., Kowalik T.F., Luzuriaga K. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 genetic variability in peripheral blood B cells and oropharyngeal fluids. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 7, pp. 3744–3755. doi: 10.1128/JVI.03378-13
39. Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.*, 1987, vol. 61, no. 5, pp. 1310–1317. doi: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
40. Sitki-Green D., Covington M., Raab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein–Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 3, pp. 1840–1847. doi: 10.1128/jvi.77.3.1840-1847.2003
41. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., AlMarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033. doi: 10.1371/journal.pone.0189033
42. Telford M., Hughes D.A., Juan D., Stoneking M., Navarro A., Santpere G. Expanding the geographic characterisation of Epstein–Barr virus variation through gene-based approaches. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 11: 1686. doi: 10.3390/microorganisms8111686
43. Tierney R.J., Edwards R.H., Sitki-Green D., Croom-Carter D., Roy S., Yao Q.-Y., Raab-Traub N., Rickinson A.B. Multiple Epstein–Barr virus strains in patients with infectious mononucleosis: comparison of ex vivo samples with in vitro isolates by use of heteroduplex tracking assays. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 193, pp. 287–297. doi: 10.1086/498913
44. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156
45. Vaysberg M., Hatton O., Lambert S.L., Snow A.L., Wong B., Krams S.M., Martinez O.M. Tumor-derived variants of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 52, pp. 36573–36585. doi: 10.1074/jbc.M802968200
46. Xue W.Q., Wang T.M., Huang J.W., Zhang J.B., He Y.Q., Wu Z.Y., Liao Y., Yuan L.L., Mu J., Jia W.H. A comprehensive analysis of genetic diversity of EBV reveals potential high-risk subtypes associated with nasopharyngeal carcinoma in China. *Virus Evol.*, 2021, vol. 7, no. 1: veab010. doi: 10.1093/ve/veab010

Авторы:

Попкова М.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Брызгалова Д.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Сахарнов Н.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Соболева Е.А., врач-инфекционист ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия;
Кулова Е.А., к.м.н., врач-инфекционист, аллерголог-иммунолог ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Utkin O.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Bryzgalova D.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Sakharnov N.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Soboleva E.A., Infectologist, Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Kulova E.A., PhD (Medicine), Infectologist, Allergologist and Immunologist, Tonus Krokha and Family Dentistry Clinic LLC, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2022
 Принята к печати 26.03.2023

Received 31.10.2022
 Accepted 26.03.2023