

© Сапега Е.Ю., Бутакова Л.В., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Гарбуз Ю.А., Балахонов С.В., Каравянская Т.Н., Носков А.К., Лебедева Л.А., Резник В.И., Севостьянова А.В., 2018

УДК 616.98:578.835.1 Enterovirus-07-093(571.620)

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЫЯВЛЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РИСКОВ ЗАВОЗА ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИЮ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

Е.Ю. Сапега¹, Л.В. Бутакова¹, О.Е. Троценко¹, Т.А. Зайцева^{1,2}, Ю.А. Гарбуз³, С.В. Балахонов⁴,
Т.Н. Каравянская^{1,2}, А.К. Носков⁴, Л.А. Лебедева^{1,3}, В.И. Резник^{1,3}, А.В. Севостьянова⁴

¹ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора,
ул. Шевченко, 2, г. Хабаровск, 680000, Россия

²Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю,
ул. Карла Маркса, 109-Б, г. Хабаровск, 680009, Россия

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае»,
ул. Владивостокская, 9, г. Хабаровск, 680013, Россия

⁴ФКУЗ «Иркутский Орден Трудового Красного Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора,
ул. Трилиссера, 78, г. Иркутск, 664047, Россия

Нестабильная эпидемиологическая ситуация по энтеровирусной инфекции в мире на фоне тесных международных взаимоотношений значительно повышает риск завоза возбудителей на территорию Российской Федерации. Целью исследования было выявление эпидемиологических рисков завоза энтеровирусной инфекции на территорию Хабаровского края.

Проведены молекулярно-эпидемиологические исследования 481 пробы из окружающей среды и клинического материала от больных энтеровирусной инфекцией, контактных лиц. Реконструкцию филогенетических взаимоотношений осуществляли с использованием методов байесовского моделирования. При молекулярно-эпидемиологическом исследовании установлено, что доминирующими серотипами для Хабаровского края являются энтеровирусы группы В (Коксаки В-4, В-5, ECHO-6,9,30). Проведенный с помощью метода молекулярных часов анализ эволюционных дистанций позволил выявить возможную эпидемиологическую связь между случаями заболеваний в Хабаровском крае и в других субъектах Российской Федерации, а также связь со случаями энтеровирусной инфекции в таких странах, как Китайская Народная Республика, Нидерланды, Индия. Выявлены потенциальные риски завоза энтеровирусов Коксаки В-4, В-5, ECHO-6,9,30 в Хабаровский край из стран Азиатско-Тихоокеанского региона и Европы, а также других регионов России.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция; энтеровирусы; риск завоза возбудителей; молекулярно-эпидемиологические исследования.

E.Yu. Sapega, L.V. Butakova, O.E. Trotsenko, T.A. Zaitseva, Yu.A. Garbuz, S.V. Balakhonov, T.N. Karav'yanskaya, A.K. Noskov, L.A. Lebedeva, V.I. Reznik, A.V. Sevost'yanova □ **THE ROLE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS IN DETECTION OF POTENTIAL IMPORTATION OF ENTEROVIRUS INFECTION IN THE KHABAROVSK REGION** □ Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, 2, Shevchenko str., Khabarovsk, 680000, Russia; Administration of Rosпотребнадзор in the Khabarovsk region, 109-B Karl Marks str., Khabarovsk, Russia; Khabarovsk Region Hygienic and Epidemiological Center, 9 Vladivostokskaya str., Khabarovsk, 680013, Russia; Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and the Far East, 78 Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russia.

The unstable epidemiologic situation regarding enterovirus infection against the background of strong international interaction increases the risk of importation of the pathogens in the Russian Federation. The aim of the research was to evaluate the epidemiologic risks of importation of the enterovirus infection in the Khabarovsk region.

Molecular epidemiologic analysis was performed for 481 samples obtained from sewage as well as clinical material from patients with enterovirus infection and exposed persons. The phylogenetic reconstruction was performed according with the Bayesian modeling approach. The molecular epidemiologic research has shown that in the Khabarovsk region enteroviruses of group B (Coxsackievirus B4, B5, ECHO 6, ECHO 9, ECHO 30) were dominant. The molecular-clock analysis used in order to evaluate evolutionary distances highlighted the epidemiologic connection between the cases of enterovirus infection diagnosed in the Khabarovsk region and other regions of the Russian Federation, China, Netherlands and India. The study revealed a potential risk of introduction of the following enteroviruses in the Khabarovsk region - Coxsackievirus B4, B5, ECHO 6, ECHO 9, ECHO 30 from countries of the Asian-Pacific Region, Europe and other regions of the Russian Federation.

Key words: enterovirus infection, enteroviruses, the risk of importation of the pathogens, molecular epidemiologic research.

В мире сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по энтеровирусной инфекции (ЭВИ), которая определяется степенью эпидемической опасности ряда территорий, эндемичных по данному заболеванию. В

последнее время в ряде стран Азиатско-Тихоокеанского региона (АТР) – в Китайской Народной Республике (КНР), Японии, Республике Корея, Малайзии, Сингапуре, Таиланде и Вьетнаме – растет число случаев одной из клиниче-

ских форм ЭВИ – экзантемы полости рта и конечностей (HFMD). Так, по состоянию на 17 января 2017 года в 2016 году в КНР зарегистрировано 2 468 174 случая HFMD, во Вьетнаме – 48 866 случаев, в Японии – 69 121 случай. При этом отмечается смена преобладающего серотипа возбудителя, вызывающего HFMD, с энтеровируса 71-го типа на Коксаки А-6. Нестабильная эпидемиологическая ситуация по ЭВИ, обусловленная в том числе и другими серотипами энтеровирусов (ЭВ), на фоне тесных международных взаимоотношений в различных сферах деятельности (туризм, деловые, спортивные, культурные, религиозные и другие мероприятия) значительно повышает риск завоза возбудителей с высоким эпидемическим потенциалом на территорию Российской Федерации (РФ), что особенно актуально для приграничных субъектов.

Более того, чрезвычайно высокая пластичность генома энтеровирусов определяет их большое разнообразие, в результате которого в разных географических зонах мира появляются новые либо генетически измененные штаммы. В свою очередь, геномные перестройки могут стать причиной изменения патогенных и вирулентных свойств ЭВ [4]. Эволюция возбудителей ЭВИ приводит к эпидемическим осложнениям, либо проявляющимся в форме локальных эпидемических вспышек заболеваний, либо захватывающим ряд государств вследствие трансграничного распространения ЭВ. Кроме того, возможная импортиция нетипичных штаммов ЭВ из других регионов в пределах одной страны также может привести к эпидемическим осложнениям ввиду отсутствия защитной иммунной прослойки у проживающего населения.

Объектом целенаправленного молекулярно-эпидемиологического анализа с филогенетическим исследованием штаммов энтеровирусов, циркулирующих среди населения и во внешней среде, стала территория Хабаровского края, для которой характерна высокая эндемичность в отношении ЭВИ. Вместе с тем данный субъект имеет приграничное расположение с КНР и территориальную близость с другими странами АТР, определяющие тесные внешнеэкономические связи с ними. Данное обстоятельство диктует необходимость изучения молекулярно-генетических характеристик типичных и нетипичных штаммов ЭВ, имеющих как местное, так и завозное происхождение.

Цель исследования – выявление эпидемиологических рисков завоза ЭВИ на территорию Хабаровского края.

Материалы и методы. В лаборатории Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ (ДВРНИМ Центр), расположенного на базе ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, в период с 2014 по 2016 год исследована 481 проба материала от больных ЭВИ, контактных лиц и из объектов окружающей среды, поступившая из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае».

РНК энтеровирусов выявляли методом ОТ-ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс® Enterovirus-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Для амплификации участка VP1 генома энтеровирусов применяли двухраундовое термоциклирование со следующими парами праймеров: 222 (5'-

CICGIGGGIAYRWACAT-3') и 224 (5'-GCIATGYTIGGIACICAYRT-3') для первого раунда, AN88 (5'-TACTGGACCACCTGGNGGNAIRWACAT-3') и AN89 (5'-CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG -3') – для второго раунда [21].

Полученные продукты ПЦР определяли методом электрофореза в агарозном геле, очистку из которого проводили с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля производства ООО «БиоСилика» (Новосибирск) согласно рекомендациям производителя.

Нуклеотидные последовательности были получены с помощью автоматического генетического анализатора *Applied Biosystems 3500* с использованием набора реагентов *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* и праймеров AN 232 (5'-CCAGCACTGACAGCA -3') и AN 233 (5'-TACTGGACCACCTGG -3').

Реконструкцию филогенетических взаимоотношений осуществляли с использованием методов байесовского моделирования, которые позволяют проводить датирование эволюционных событий с достоверностью 95,0 % [24]. Статистическую обработку данных выполняли при помощи программного обеспечения BEAST v.1.8.4, где автоматически рассчитывается байесовский доверительный интервал (БДИ) [13]. Были использованы: модель *SRD06*, *Constant size model u uncorrelated relaxed clock*. Запуск был сделан для 25 млн генераций. В *Tracer v1.6* было оценено качество пометки ($ESS > 200$). Все запуски были сделаны в двух повторах. Деревья были аннотированы в *TreeAnnotator v.1.8.4*, первые 10 % были отброшены при построении *Maximum Clade Credibility (MCC)* деревьев. Для визуализации использовалась *Fig-Tree v1.4.3*.

Результаты исследования. В Хабаровском крае, как и в целом по России, ежегодно регистрируются летне-осенние подъемы заболеваемости энтеровирусной инфекцией, однако краевые показатели заболеваемости ЭВИ значительно превышают общероссийские (от 5,7 раза в 2010 году до 24,5 раз в 2006 году).

На территории Хабаровского края отмечена циркуляция ЭВ как российского, так и зарубежного происхождения, доминирующая роль принадлежит энтеровирусам групп В и А. Наиболее эпидемически значимыми энтеровирусами для Хабаровского края на протяжении многих лет являются Коксаки В-4, В-5, ЕСНО-6,9,30, а в последние 3 года – и Коксаки А-6.

До 2008 года энтеровирус Коксаки А-6 циркулировал преимущественно в странах АТР, с 2013 года распространился на территориях России, Европы и Карибского бассейна [2, 6]. Вспышки, вызванные этим вирусом, регистрировались в КНР, Японии, Таиланде, Италии, Франции, Республике Куба [15]. Инфекционный процесс, обусловленный данным серотипом, чаще всего проявляется в виде герпангины, атипичной экзантемы и HFMD с тяжелым течением заболевания [23]. Исследователями из Финляндии описано редко встречающееся осложнение в виде ониходистрофии с полным отслоением ногтевой пластины, проявившееся через 2 месяца после перенесенной Коксаки А6 инфекции [22].

В субъектах Дальневосточного федерального округа (ДФО) РФ энтеровирус Коксаки А-6 стал выявляться с 2009 года, и за последние три года количество выделенных молекулярно-

генетическими методами штаммов этого возбудителя возросло. Вспышки энтеровирусной инфекции, обусловленные Коксаки А-6, регистрировались в Амурской и Сахалинской областях, а также в Хабаровском крае. Так, штаммы Коксаки А-6, выделенные в 2016 году от больных, проживающих в Хабаровском крае, в том числе и из эпидемического очага заболеваемости, зарегистрированного в детском организованном коллективе села Бичевая Хабаровского края, на филограмме сформировали единую группу

вирусов, имеющих высокую степень гомологии между собой (99–100%). Наиболее генетически сходными с ними оказались энтеровирусы, вызвавшие вспышки HFMD в китайских провинциях Аньян и Вэньчжоу в период с 2012 по 2015 год. Китайские штаммы образовали с хабаровскими изолятами 2016 года единый кластер, что указывает на возможную эпидемиологическую связь случаев заболеваний в РФ и КНР (рис. 1). Проведенный с помощью метода молекулярных часов анализ эволюционных дис-

танций между вирусами Коксаки А-6, циркулировавшими в разное время в КНР и Хабаровском крае, позволил выявить расхождение признаков между китайскими и хабаровскими штаммами внутри сформированного ими кластера, которое произошло примерно 3–4 года назад (в 2012–2013 гг.).

Энтеровирус Коксаки В-5 имеет широкое распространение в мире. По данным литературы, с циркуляцией энтеровируса этого типа связывают более тяжелое течение инфекции и рост числа вспышек. Чаще всего вирус Коксаки В-5 вызывает поражение нервной системы различной степени тяжести, проявляющееся в виде серозно-вирусного менингита (СВМ), энцефалита, паралича [29]. Кроме того, в некоторых случаях Коксаки В-5 является причиной экзантемы полости рта и конечностей (HFMD), герпангины, также имеются сообщения о связи данного энтеровируса с возникновением диабета 1-го типа [16]. Вспышки ЭВИ, ассоциированные с Коксаки В-5, были зарегистрированы в США, Греции, Бельгии [19]. В приграничном с Хабаровским краем Китае групповая заболеваемость серозным менингитом среди детского населения, обусловленная этим серотипом, регистрировалась в провинциях Шаньдун в 2005 и 2009 гг. и Хэйнань в 2009 г. [12].

Для Хабаровского края энтеровирус Коксаки В-5 является характерным и ежегодно выделяется как из клинического материала от больных, так и из проб сточной воды. В 2016 году данный возбудитель вызвал групповую заболеваемость среди детей летнего оздоровительного учреждения «Олимп», расположенного в селе Бычиха Хабаровского района.

Филогенетический анализ штаммов Коксаки В-5, выделенных на территории Хабаровского края в период с 2014 по 2016 год, продемонстрирован на рис. 2. При этом штаммы Коксаки В-5 сгруппировались на филограмме в два кластера.

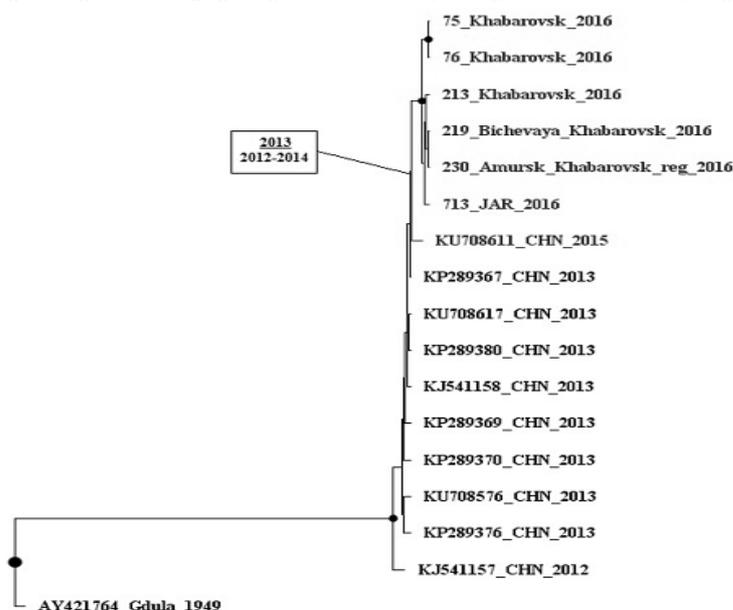


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (294 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса Коксаки А-6, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v 1.8.1. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95.

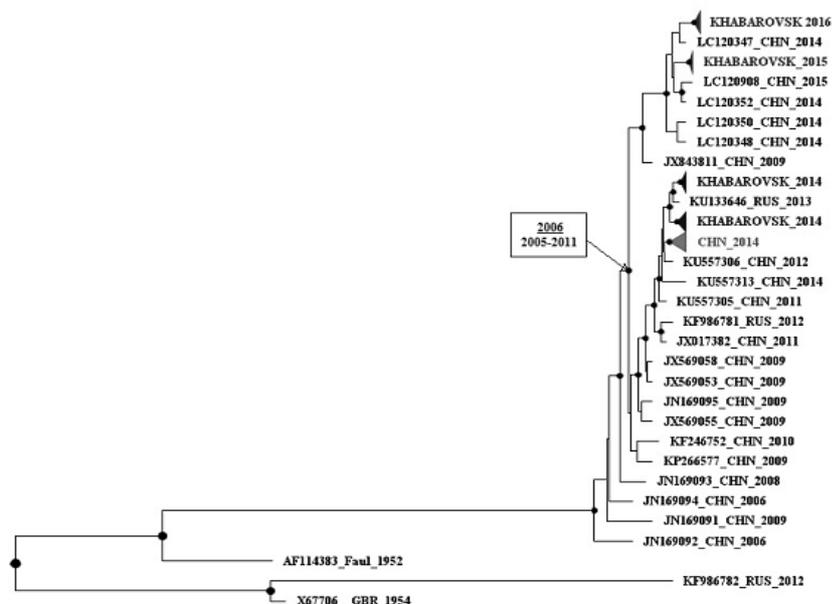


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (313 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса Коксаки В-5, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v 1.8.1. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95.

Первый кластер сформировали хабаровские вирусы 2014 года совместно с российским 2013 года, изолированным от больного серозно-вирусным менингитом из Омской области, а также со штаммами, выделенными в Китае в период с 2009 по 2014 год. Скорее всего, импортирование в РФ энтеровирусов Коксаки В-5, вошедших в данный кластер, произошло из стран АТР, а затем из других регионов РФ – в Хабаровский край. Позднее 2014 года циркуляция энтеровирусов первого кластера не отмечена вообще.

Второй кластер составили хабаровские штаммы Коксаки В-5, выделенные от больных ЭВИ в 2015–2016 гг., и китайские штаммы 2014–2015 гг. от больных острым вялым параличом (ОВП), что позволяет предположить направление завоза энтеровируса Коксаки В-5 данного кластера – из КНР в Хабаровский край.

Таким образом, в пределах Хабаровского края обнаружены значительные генетические различия в популяции вирусов Коксаки В-5, циркулировавших в разные промежутки времени. Определен период, в который произошла дивергенция генетических признаков Коксаки В-5 между первым и вторым кластерами – с 2005 по 2011 год (при 95 % БДИ). При этом единый предшественник для энтеровирусов Коксаки В-5, входящих в оба кластера, существовал примерно до 2006 года.

В последнее десятилетие растет количество сообщений о выявлении энтеровируса ЕСНО-9 среди больных с асептическим менингитом и ОВП [14]. В то же время описаны и другие клинические формы, обусловленные энтеровиру-

сом ЕСНО-9, такие как экзантема, гастроэнтерит, молниеносный гепатит [20]. Примечательно, что в период с 2006 по 2008 год вирус ЕСНО-9 входил в тройку лидеров среди всех типов энтеровирусов, выделенных от больных в США.

В Хабаровском крае данный серотип выявлялся периодически: в 2007 году, в период с 2011 по 2013 год, в 2016 г. Летом 2016 года, вновь появившись в пейзаже циркулирующих в крае энтеровирусов, ЕСНО-9 стал причиной формирования очага групповой заболеваемости ЭВИ в детском оздоровительном учреждении «Энергетик». Энтеровирус ЕСНО-9 был выделен в 2016 году и от других больных г. Хабаровска и Хабаровского района, что свидетельствовало о распространении данного серотипа среди населения этих административных территорий.

На филограмме выделенные в 2016 г. из очага групповой заболеваемости ЭВИ штаммы ЕСНО-9 сформировали монофилетическую группу (рис. 3). Их возможными предшественниками были вирусы, изолированные в Индии от больных ОВП в 2009 году, на что указывает 95%-й доверительный интервал, составивший 8 лет. Данный анализ позволил предположить, что вирус ЕСНО-9 был занесен на территорию России из Индии в период с 2007 по 2009 год, а в дальнейшем распространился по субъектам РФ. Возможность импортирования ЕСНО-9 подтверждена и другими исследователями, которые предполагали как минимум 4 заноса данного возбудителя ЭВИ на территорию РФ из разных стран в период с 2009 по 2016 год [1].

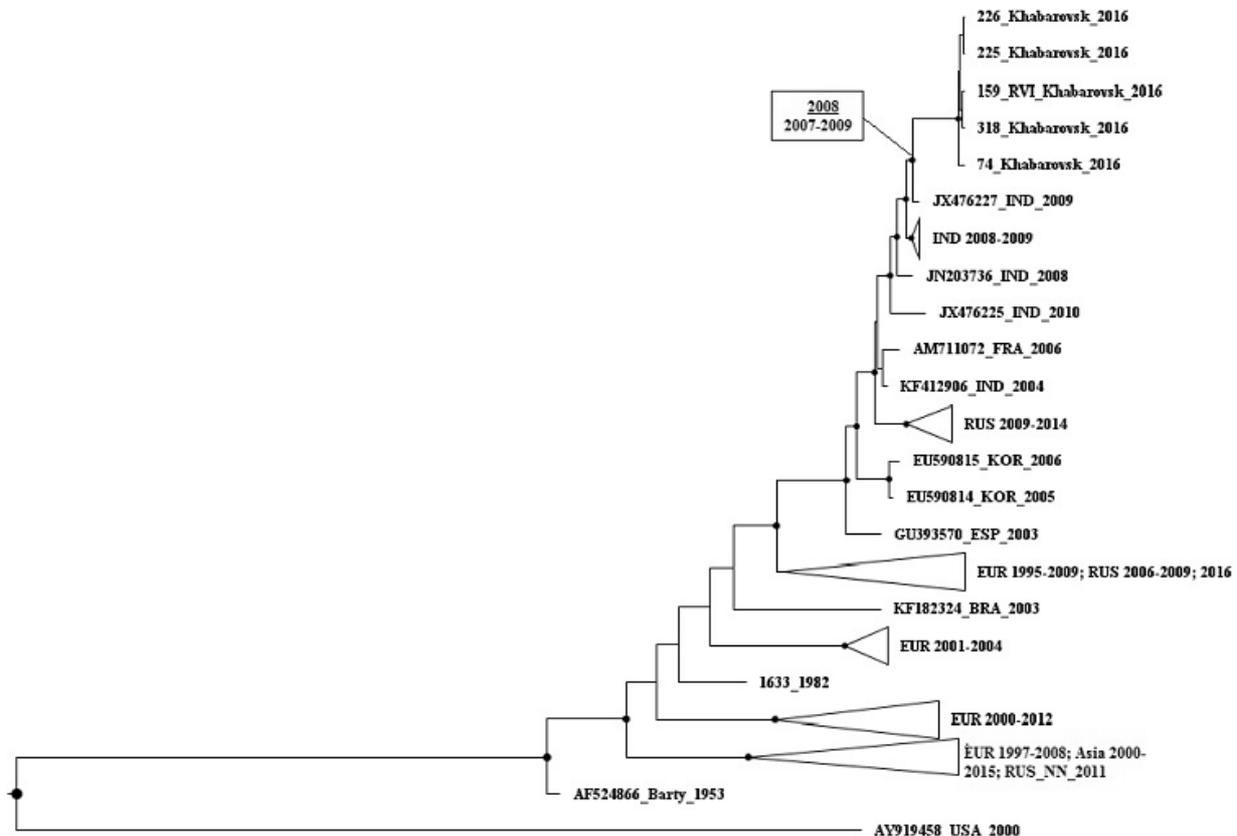


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (319 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса ЕСНО-9, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v 1.8.1. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95

Известно, что выраженной нейротропностью обладает и широко распространенный в мире энтеровирус ЕСНО-6. В период с 2006 по 2014 год он выявлялся у больных асептическим менингитом в Польше [26] и странах бывшего Советского Союза [3], в 2011 году – в Республике Мадагаскар у здоровых людей и в Таиланде среди больных инфекцией верхних дыхательных путей [28], а начиная с 2015 года активно циркулирует в странах Ближнего Востока, АТР, Европы. Так, в Нидерландах в 2016 году по сравнению с предыдущими годами (2014–2015 гг.) отмечено увеличение числа случаев асептического менингита, обусловленного энтеровирусом ЕСНО-6 [10].

Среди субъектов Российской Федерации серотип ЕСНО-6 вызывал значительный подъем заболеваемости СВМ на территории Хабаровского края в 2006 и 2011 годах. В последующие годы на территории края (в период с 2012 по 2015 год) он определялся спорадически, но в 2016 году стал этиологической причиной очага групповой заболеваемости ЭВИ (с числом пострадавших 9 детей) в «Детском доме № 24» г. Николаевска-на-Амуре Хабаровского края. У всех заболевших в данном эпидемическом очаге энтеровирусная инфекция протекала в виде респираторной формы. Кроме того, в начале сезона 2016 года вне эпидемического очага был изолирован еще один штамм энтеровируса ЕСНО-6 (от больного из г. Хабаровска), который значительно отличался от вирусов, идентифицированных в очаге групповой заболеваемости. При реконструкции филогенетических отношений хабаровские и николаевские штаммы ЕСНО-6 2016 года вошли в два различных кластера с уровнем дивергенции нуклеотидных последовательностей в пределах 16,0–23,0 % (рис. 4).

Первый кластер представлен идентичными между собой штаммами ЕСНО-6 из г. Николаев-

ска-на-Амуре 2016 г. и из Нидерландов 2014 г., Индии 2009–2011 гг., Финляндии 2008 г., России 2005–2006 гг., в том числе изолятами из г. Комсомольска-на-Амуре, выделенными в 2006 году, то есть в год значительного подъема заболеваемости ЭВИ (СВМ) в Хабаровском крае. Следовательно, для энтеровируса ЕСНО-6, периодически вызывающего эпидемиологические осложнения по ЭВИ в Хабаровском крае, характерно наличие родственных штаммов, как эволюционировавших в данном регионе на протяжении нескольких лет, так и распространившихся в других странах мира. Более того, филогенетический анализ показал, что штаммы ЕСНО-6 из г. Николаевска-на-Амуре 2016 г. и из Нидерландов 2014 г. имели общего предшественника, который существовал примерно в 2012 году, а 95 % БДИ равен 2010–2013 гг.

Во второй кластер вошли хабаровские штаммы ЕСНО-6 2014 и 2016 гг. (при этом штамм 2014 года не вызвал значительного подъема заболеваемости в год циркуляции) совместно с азиатскими (Китай 2008–2015 гг., Япония 2013 г.) и польскими штаммами 2012 и 2014 гг. Единный предшественник для энтеровирусов данного кластера существовал примерно в 2007 году (95 % БДИ равен 2006–2008 гг.).

Таким образом, на территории Хабаровского края в 2016 году одновременно циркулировали 2 генетические линии ЕСНО-6, имевшие разных предшественников, а, следовательно, и различное происхождение. Не исключена вероятность их завоза на территорию Хабаровского края как из-за рубежа, так и из других регионов России.

Энтеровирус Коксаки В-4 распространен повсеместно в мире, в том числе в РФ, вызывая широкий спектр клинических проявлений. Например, исследователи из Тайваня зафиксировали преобладание герпангиты среди клинических

форм, также ими были отмечены два летальных случая миокардита, обусловленного этим энтеровирусом [18]. В китайской провинции Юньнань Коксаки В-4 стал причиной асептического менингита у детей в 2009 г., а в 2010 году – вспышки HFMD в одном из автономных районов КНР [25]. Рядом зарубежных исследователей получены данные о связи Коксаки В-4 с возникновением диабета 1-го типа [8] и тяжелых полиорганов поражений [11].

В Хабаровском крае вирус Коксаки В-4 выделяется из материала от больных ЭВИ практически ежегодно, однако в 2016 году он стал преобладающим в структуре всех изолированных серотипов энтеровирусов. Углубленному молекулярно-генетическому исследованию подвергнуты штаммы Коксаки В-4, полученные преимущественно из клинического ма-

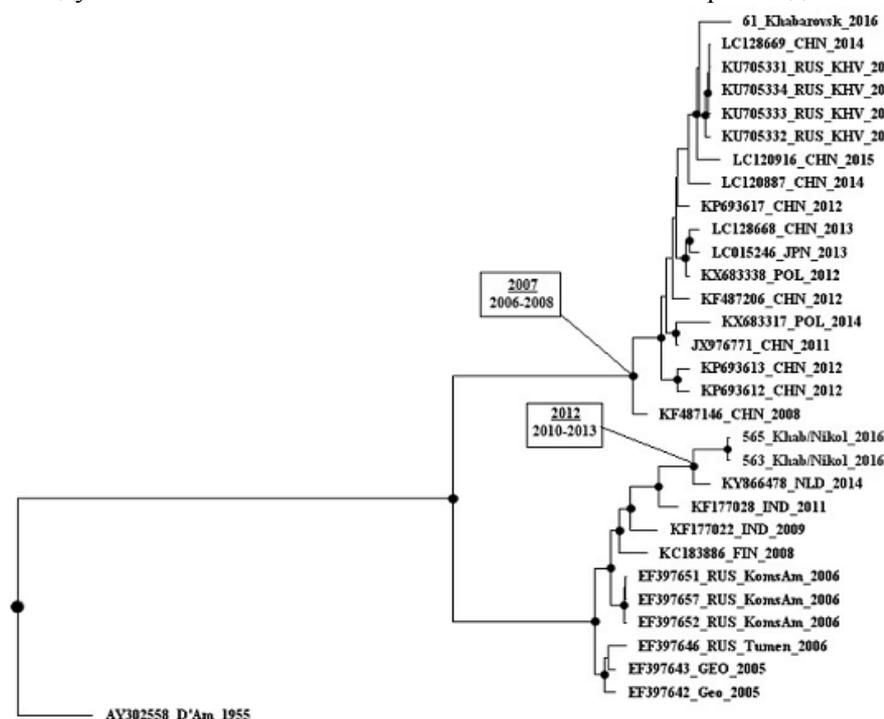


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (324 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса ЕСНО-6, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v 1.8.1. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95

териала от больных г. Хабаровска. Филогенетический анализ хабаровских штаммов 2016 года выявил их близкое (94–96 %) сходство с вирусами, циркулировавшими в том же году в Камчатском крае, и изолятами, выделенными двумя-тремя годами ранее (2013–2014 гг.) в городах Санкт-Петербурге и Хабаровске. Уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей указанных штаммов Коксаки В-4 варьировал от 5,2 до 6,3 %.

На дендрограмме (рис. 5) российские штаммы Коксаки В-4 сформировали единый кластер совместно с изолятами вирусов из Японии (полученных из сточной воды в 2013 году), Германии (выделенных от больного сахарным диабетом в 2006 году) и Центральной Африканской Республики (2001 год). Причем выявлен общий предок для всех вирусов, вошедших в кластер, который существовал приблизительно в 2000 году (95 % ДИ равен 1999–2001). На территории России (Ленинградская область) штамм из этого кластера впервые был выделен в 2010 году от больного серозно-вирусным менингитом. Следует отметить, что для данного российского штамма 2010 года и штамма из Германии 2006 года выявлен общий предок, который предположительно циркулировал в 2003 году (95 % ДИ составил 2002–2005 гг.). Проведенный анализ реконструкции филогенетического дерева свидетельствует не только о длительной циркуляции этого штамма, но и о постоянном изменении генетического состава популяции вируса Коксаки В-4 и о продол-

жающемся распространении его различных генотипов как в России, так и в мире.

В 2015 году в г. Комсомольске-на-Амуре Хабаровского края зарегистрирован значительный подъем заболеваемости СБМ, обусловленный энтеровирусом ЕСНО-30. В двух других территориях ДФО (Приморский край и ЕАО) в указанный год также была отмечена циркуляция штамма ЕСНО-30. Известно, что энтеровирус ЕСНО-30 является одним из основных возбудителей серозно-вирусного менингита, который в последнее десятилетие регистрируется во всем мире, включая США, Францию, Канаду, Италию, Германию, Англию, Японию, Корею, Вьетнам, Тайвань и материковый Китай, Россию [17]. Например, в провинциях Китая было зарегистрировано несколько эпидемий, вызванных энтеровирусом ЕСНО-30 [27]. В Российской Федерации вспышки серозно-вирусного менингита, обусловленные энтеровирусом ЕСНО-30, были зарегистрированы в Нижнем Новгороде (2007 г.), в Хабаровском крае (2006 и 2011 гг.), в Приморском крае и Архангельской области (2008 г.), в Магаданской (2013 г.) и Новгородской областях (2008–2009 гг.) [5, 7]. Кроме того, в единичных случаях энтеровирус ЕСНО-30 регулярно выявлялся среди больных ЭВИ в Хабаровском крае в 2012 и 2014 годах, в Приморском крае – в 2010, 2011 и 2013 годах, в ЕАО – в 2011, 2012, 2013 и 2015 годах, в Республике Саха (Якутия) – в 2014 году. Однако явных вспышек энтеровирусного менингита в эти годы не наблюдалось.

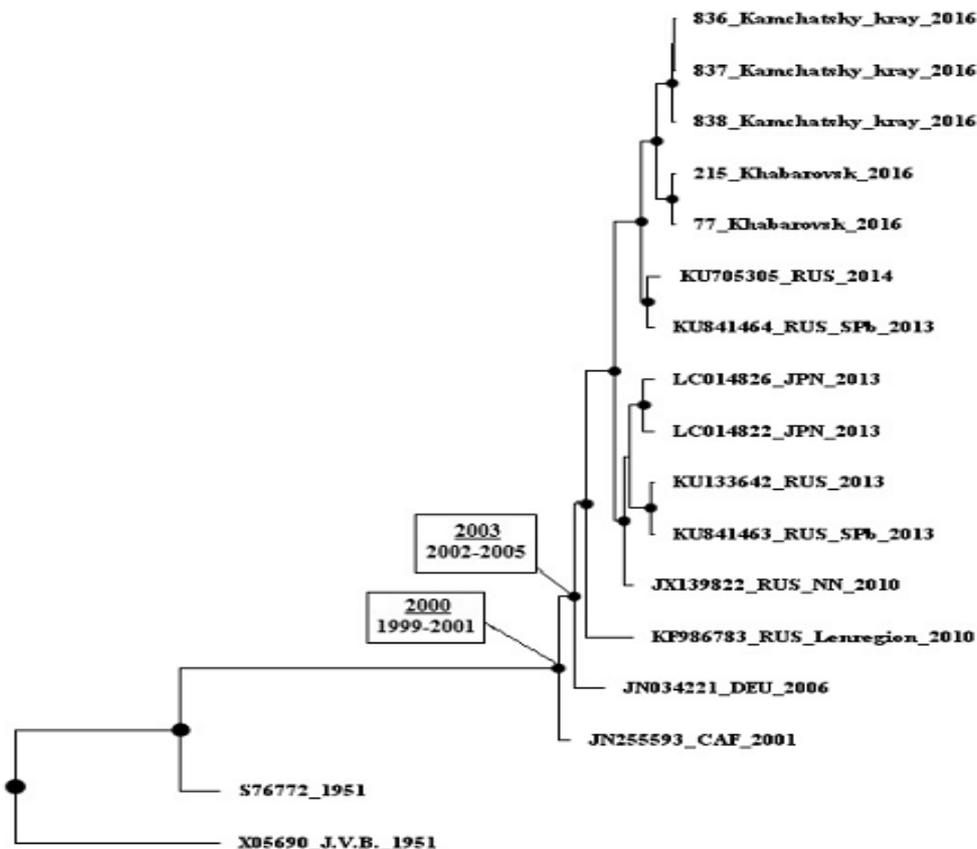


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (309 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса Коксаки В-4, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v 1.8.1. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95

Штаммы ЕСНО-30, типированные методом секвенирования в ДФО в 2014 и 2015 годах, подвергнуты филогенетическому анализу. Было установлено, что все они по классификации *J.Bailly* принадлежали к генотипу Н [9]. При этом комсомольские штаммы энтеровируса ЕСНО-30 2015 года оказались на 100 % идентичны хабаровским вирусам 2014 года, на 98 % – хабаровскому штамму 2012 года (KP090780_RUS_2012), на 100 % – штаммам, выделенным из клинических проб от больных ЕАО в 2014–2015 гг., на 96,7–97,6 % – вирусам, типированным в Приморском крае в 2015 году и в Республике Саха (Якутия) в 2014 г. На филограмме все указанные дальневосточные штаммы составили единую группу совместно с вирусами ЕСНО-30, циркулировавшими в Китае в период с 2010 по 2012 год, что свидетельствует об их эпидемиологической связи (рис. 6). Кроме того, установлено, что вирус ЕСНО-30, выделенный на указанных территориях ДФО, имеет общего предка со штаммами, циркулировавшими также и на территории западной части России в 2013 году. Следовательно, энтеровирус ЕСНО-30 генотипа Н, широко циркулирующий на территории ДФО с 2012 года по настоящее время, по всей вероятности, в результате активной миграции населения был импортирован на российский Дальний Восток как напрямую из Юго-Восточной Азии, так и через западные регионы РФ.

Заключение. На территории Хабаровского края практически ежегодно наблюдается смена лидирующего серотипа энтеровируса, что приводит к выраженному подъему заболеваемости с развитием вспышек. Отмеченная в Хабаровском крае высокая гетерогенность популяции отдельных типов энтеровирусов подтверждена закономерностями их эволюционных преобразований, приводящих к эпидемиологическим ос-

ложнениям, в том числе обусловленным завозом нетипичных для региона возбудителей ЭВИ.

Генетическое сходство выявленных на территории Хабаровского края энтеровирусов с размещенными в международной системе *GenBank* референтными штаммами, установленное посредством филогенетического анализа, указывает на возможность как трансграничной их импортации преимущественно из стран АТР, так и на занос с других территорий РФ. Так, реконструкция филогенетических взаимоотношений для наиболее актуальных для Хабаровского края штаммов выявила потенциальный риск завоза в данный регион энтеровирусов Коксаки А-6 и Коксаки В-5 – из КНР; ЕСНО-6 – из КНР, Индии, стран Европы и из других регионов России; ЕСНО-9 – из Индии; Коксаки В-4 – из России (Санкт-Петербурга, Ленинградской области, Камчатского края), Германии, Японии; ЕСНО-30 – из КНР, а также из западных и дальневосточных территорий Российской Федерации.

С целью выяснения индивидуальных характеристик штаммов энтеровирусов и генетической структуры их популяций необходимо продолжить изучение циркуляции возбудителей ЭВИ среди населения Хабаровского края и в объектах внешней среды с применением методов молекулярно-генетического типирования и филогенетического анализа.

Следует учитывать, что высокая степень генетического разнообразия энтеровирусов, приводящая к эпидемическим осложнениям, может быть обусловлена как завозом новых, нетипичных для изучаемой территории возбудителей, так и формированием субгенетических вариантов определенного штамма в пределах одной территории в результате эволюции его генома при многочисленных пассажах через восприимчивые организмы. В связи с этим в каждом конкретном случае целесообразно сопоставлять результаты генотипирования и филогенетического исследования изолированных штаммов энтеровирусов с данными эпидемиологического анализа, что позволит выявить предполагаемые источники инфекции, особенности проявления и территориального распространения заболеваемости ЭВИ с учетом геноварианта возбудителя, а в случае завозной инфекции – возможное происхождение вируса, сроки и направления предполагаемого его завоза. Особое внимание необходимо уделять случаям групповой заболеваемости в детских организованных коллективах, а также спорадическим случаям ЭВИ, зафиксированным у лиц, прибывших из зарубежных поездок. Соблюдение данных рекомендаций позволит дать более полную оценку эпидемиологической ситуации в отношении ЭВИ на конкретной территории и, в случае необходимости, своевременно скорректировать профилактические и противоэпидемические мероприятия по недопущению завоза и дальнейшего распространения эпидемически значимых вариантов энтеровирусов.

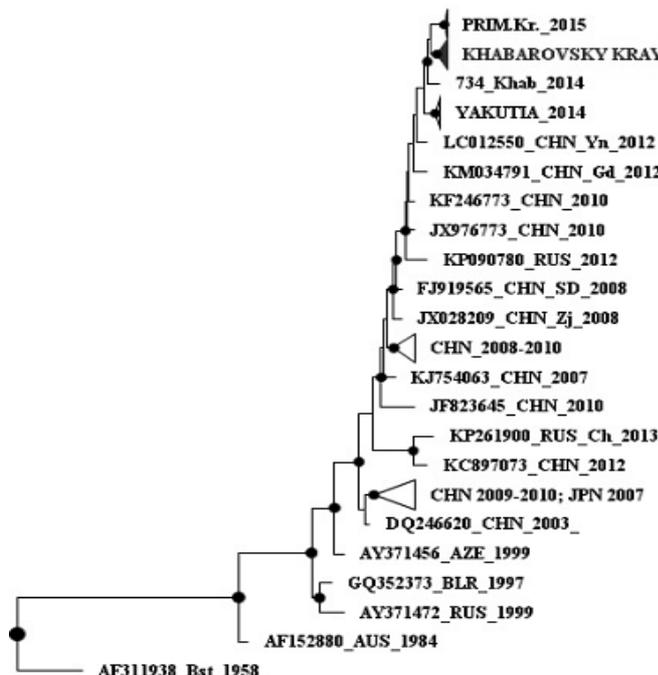


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (255 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса ЕСНО-30, с использованием алгоритма *MrBayes* в версии *MrBayes 3.2.1*. Кружочками отмечены узлы апостериорной вероятности выше 0,95

ЛИТЕРАТУРА
(п. 8–29 см. References)

- Голицына Л.Н., Зверев В.В., Епифанова Н.В. и др. Непролимиелитные энтеровирусы в Российской Федерации в 2016 году // Информационный бюллетень. 2017. № 4. С. 25–31.
 - Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В. и др. Вирус Коксаки А6 в Российской Федерации в 2014 году // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015. № 28. С. 12–20.
 - Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е. и др. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 6 – возбудителя вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. // Вопросы вирусологии. 2008. № 1 (53). С. 16–21.
 - Лукашев А.Н. Роль рекомбинации в эволюции непролимиелитных энтеровирусов // Вопросы вирусологии. 2005. № 3 (50). С. 46–51.
 - Онищенко Г.Г., Осипова Т.В., Грачева Е.В. и др. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Нижнем Новгороде в 2007 году: молекулярно-эпидемиологические аспекты // Журнал микробиологии. 2009. № 2. С. 24–30.
 - Троценко О.Е., Курганова О.П., Зайцева Т.А. и др. Использование научного потенциала в международном сотрудничестве России и Китая по вопросам противодействия эпидемическому распространению энтеровирусных инфекций // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015. № 28. С. 6–12.
 - Шишко Л.А., Романенкова Н.И., Бичурин М.А. и др. Этиология сезонных подъемов заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Архангельской области // Инфекция и иммунитет. 2013. № 1 (3). С. 65–72.
- REFERENCES**
- Golitsyna L.N., Zverev V.V., Epifanova N.V. et al. Neprolimielitnye enterovirusy v Rossijskoj Federatsii v 2016 godu. Informatsionnyj byulleten', 2017, no. 4, pp. 25–31. (In Russ.)
 - Golitsyna L.N., Zverev V.V., Parfenova O.V. et al. Virus Koksaki A6 v Rossijskoj Federatsii v 2014 godu [Coxsackievirus A6 in the Russian Federation in 2014]. Dal'nevostochnyj zhurnal infektsionnoj patologii, 2015, no. 28, pp. 12–20. (In Russ.)
 - Lukashev A.N., Reznik V.I., Ivanova O.E. et al. Molekulyarnaya epidemiologiya virusa ECHO 6 – vozбудitelya vspysyki seroznogo meningita v Khabarovske v 2006 godu [Molecular epidemiology of the ECHO 6 virus – the causative agent of serous meningitis outbreak in Khabarovsk in 2006]. Voprosy virusologii, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 16–21. (In Russ.)
 - Lukashev A.N. Rol' rekombinatsii v evolyutsii neprolimielitnykh enterovirusov [Role of recombination in the evolution of non-polio enteroviruses]. Voprosy virusologii, 2005, vol. 50, no. 3, pp. 46–51. (In Russ.)
 - Onishchenko G.G., Osipova T.V., Gracheva E.V. et al. Sezon ehnterovirusnogo seroznogo meningita v Nizhnem Novgorode v 2007 godu: molekulyarno-epidemiologicheskie aspekty [Season of enterovirus serous meningitis in Nizhny Novgorod in 2007: molecular epidemiological aspects]. Zhurnal mikrobiologii, 2009, no. 2, pp. 24–30. (In Russ.)
 - Trotsenko O.E., Kurganova O.P., Zaitseva T.A. et al. Ispol'zovanie nauchnogo potentsiala v mezhdunarodnom sotrudnichestve Rossii i Kitaya po voprosam protivodeystviya ehpidemicheskomu rasprostraneniyu ehnterovirusnykh infektsij [The use of scientific potential in international cooperation between Russia and China on combating the epidemic spread of enterovirus infections]. Dal'nevostochnyj zhurnal infektsionnoj patologii, 2015, no. 28, pp. 6–12. (In Russ.)
 - Shishko L.A., Romanenkova N.I., Bichurina M.A. et al. Ehtiologiya sezonnykh pod'emov zabolevaemosti enterovirusnoj infektsiej v Arkhangel'skoj oblasti [Etiology of seasonal rises in the incidence of enterovirus infection in the Arkhangelsk region]. Infektsiya i immunitet, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 65–72. (In Russ.)
 - Alidjinou E.K., Sané F., Bertin A. et al. Persistent infection of human pancreatic cells with Coxsackievirus B4 is cured by fluoxetine. / E.K. Alidjinou, F. Sané, A. Bertin [et al.] // Antiviral Research. 2015. Vol. 116. P. 51–4.
 - Bailly J.L., Mirand A., Henquell C. et al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene / J.L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. 2009. Vol. 9(4). P. 699–708.
 - Benschop K.S., Geeraedts F., Beuvink B., Spit S.A., Fanoy E.B., Claas E.C. et al. Increase in ECHOvirus 6 infections associated with neurological symptoms in the Netherlands, June to August 2016 / K.S. Benschop, F. Geeraedts, B. Beuvink [et al.] // Eurosurveillance. 2016. Vol. 21(39). DOI: 10.2807/1560-7917.
 - Bissel S.J., Winkler C.C., DelTondo J. Coxsackievirus B4 myocarditis and meningoencephalitis in newborn twins / S.J. Bissel, C.C. Winkler, J. DelTondo // Neuropathology. 2014. Vol. 34(5). P. 429–37.
 - Chen P., Tao Z., Song Y., Liu G., Wang H., Liu Y. et al. A Coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong Province, China in 2009 / P. Chen, Z. Tao, Y. Song [et al.] // Journal of Medical Virology 2013. Vol. 85(3). P. 483–9.
 - Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. / A.J. Drummond, M.A. Suchard, D. Xie, A. Rambaut // Molecular Biology and Evolution. 2012. Vol. 29(8). P. 1969–73.
 - Dorta-Contreras A.J., Reiber H., Magraner-Tarrau M.E., Weisbrich B., Interián-Morales M.T., Noris-García E. et al. Intrathecal synthesis pattern of immunoglobulins in meningoencephalitis epidemic due to echovirus 9 / A.J. Dorta-Contreras, H. Reiber, M.E. Magraner-Tarrau [et al.] // Revista de Neurologia. 2002. Vol. 35(10). P. 904–7.
 - Feder HM Jr., Bennett N., Modlin J.F. Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackievirus A6 / H.M. Jr. Feder, N. Bennett, J.F. Modlin // The Lancet Infectious Disease. 2014. Vol. 14(1). P. 83–6. DOI: 10.1016/S1473-3099 (13) 70264–0.
 - Kim K.W., Ho A., Alshabee-Akil A., Hardikar A.A., Kay T.W., Rawlinson W.D. et al. Coxsackievirus B5 Infection Induces Dysregulation of microRNAs Predicted to Target Known Type 1 Diabetes Risk Genes in Human Pancreatic Islets / K.W. Kim, A. Ho, A. Alshabee-Akil [et al.] // Diabetes. 2016. Vol. 65(4). P. 996–1003.
 - Kim H.J., Kang B., Hwang S. et al. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008 / H.J. Kim, B. Kang, S. Hwang [et al.] // Virology Journal. 2012. Vol. 9. P. 38.
 - Lee C.J., Huang Y.C., Yang S., Tsao K.C., Chen C.H., Hsieh Y.C. et al. Clinical features of Coxsackievirus A4, B3 and B4 infections in children / C.J. Lee, Y.C. Huang, S. Yang [et al.] // PLoS One. 2014; 9(2):e87391. DOI: 10.1371/journal.pone.0087391.
 - Liu N., Jia L., Yin J., Wu Z., Wang Z., Li P. et al. An outbreak of aseptic meningitis caused by a distinct lineage of Coxsackievirus B5 in China / N. Liu, L. Jia, J. Yin [et al.] // International Journal of Infectious Diseases. 2014. Vol. 23. P. 101–4.
 - Morgan C., Thomson S.J., Legg J., Narat S.A. Case of Fulminant Hepatitis due to Echovirus 9 in a Patient on Maintenance Rituximab Therapy for Follicular Lymphoma / C. Morgan, S.J. Thomson, J. Legg [et al.] // Case Reports in Hematology. Volume 2015 (2015), Article ID 454890. DOI: 10.1155/2015/454890.
 - Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens / W.A. Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch // Journal of Clinical Microbiology 2006. Vol. 44(8). P. 2698–704.
 - Österback R., Vuorinen T., Linna M., Susi P., Hyypiä T., Waris M. Coxsackievirus A6 and Hand, Foot, and Mouth Disease, Finland / R. Österback, T. Vuorinen, M. Linna [et al.] // Emerging Infectious Diseases. 2009. Vol. 15(9). P. 1485–8.
 - Renert-Yuval Y., Marva E., Weil M., Shulman L.M., Gencylmaz N., Sheffer S. et al. Coxsackievirus A6 Polymorphic Exanthem in Israeli Children / Y. Renert-Yuval, E. Marva, M. Weil [et al.] Acta Dermato-Venereologica. 2016. Vol. 96 (4). P. 546–9.
 - Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences / B. Shapiro, A. Rambaut, A.J. Drummond // Molecular Biology and Evolution. 2006. Vol. 23(1). P. 7–9.
 - Tian X., Zhang Y., Gu S. et al. New Coxsackievirus B4 genotype circulating in Inner Mongolia Autonomous Region, China / X. Tian, Y. Zhang, S. Gu [et al.] // PLoS One. 2014; 9(3):e90379. DOI: 10.1371/journal.pone.0090379.
 - Wieczorek M., Krzyszczoszek A., Ciągła A., Figas A. Molecular characterization of environmental and clinical echovirus 6 isolates from Poland, 2006–2014 / M. Wieczorek, A. Krzyszczoszek, A. Ciągła [et al.] // Journal of Medical Virology. 2017. Vol. 89(5). P. 936–40.
 - Xiao H., Huang K., Li L. et al. Complete genome sequence analysis of human echovirus 30 isolated during a large outbreak in Guangdong Province of China, in 2012 / Xiao H., K. Huang, L. Li [et al.] // Archives of Virology. 2014. Vol. 159. P. 379–83.
 - Zhou Y., Fernandez S., Yoon I.K., Simasathien S., Watanaveeradej V., Yang Y. et al. Metagenomics Study of Viral Pathogens in Undiagnosed Respiratory Specimens and Identification of Human Enteroviruses at a Thailand Hospital / Y. Zhou, S. Fernandez, I.K. Yoon [et al.] // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2016. Vol. 95(3). P. 663–9.
 - Zhu Y., Zhou X., Liu J., Xia L., Pan Y., Chen J. et al. Molecular identification of human enteroviruses associated with aseptic meningitis in Yunnan province, Southwest China / Y. Zhu, X. Zhou, J. Liu [et al.] // SpringerPlus 2016. Vol. 5(1). P. 1515. DOI.org/10.1186/s40064-016-3194-1.

Контактная информация:

Сапега Елена Юрьевна, кандидат медицинских наук, руководитель Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора тел.: +7 (4212) 46-18-52, e-mail: adm@hniiem.ru

Contact information:

Sapega Elena, Candidate of Medical Sciences, Head of the Far East Regional Scientific and Methodical Center for Study of Enterovirus Infections of Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор phone: +7 (4212) 46-18-52, e-mail: adm@hniiem.ru