

УДК 578.5:616.34-002-053.2(471.341)

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБНАРУЖЕННЫХ У ДЕТЕЙ С ГАСТРОЭНТЕРИТОМ В НИЖНЕМ НОВГОРОДЕ

С.Г. Фомина, Л.Н. Голицына, Н.А. Новикова, Н.В. Епифанова, Л.Б. Луковникова, О.В. Парфенова, ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»

*Новикова Надежда Алексеевна – раб. тел.: (831) 438-02-21.*

За период 2006-2008 гг. было проведено исследование 2291 образца копроматериала детей с ОКИ. Энтеровирусы человека были обнаружены в 12,1% случаев (6,8-18,3%). В 7,6% случаев вирусных гастроэнтеритов была зафиксирована моноэнтеровирусная инфекция. Энтеровирусы геногруппы I были выявлены в 43,9%, в 37,1% обнаружены энтеровирусы геногруппы II, в 9,4% случаев было выявлено двойное инфицирование энтеровирусами геногрупп I и II. В 2006 г. распределение штаммов ЭВ1:ЭВII:ЭВ1+II было 20%:52,3%:13,8% (n=65), в 2007 г. – 50%:37%:8,4% (n=143), а в 2008 г. – 54,3%:22,9%:7,1% (n=70). У детей с ОГЭ, с использованием метода частичного секвенирования генома, мы обнаружили энтеровирусы вида А (Коксаки А2 и А16), энтеровирусы вида В (Коксаки А9 и ЕСНО16) и энтеровирусы вида С (Коксаки А22). Энтеровирусы вида А у детей с ОГЭ в Нижнем Новгороде обнаружены впервые.

**Ключевые слова:** энтеровирусы человека, метод ОТ-ПЦР, секвенирование генома, нуклеотидные последовательности, изолят.

Within the period of 2006-2008 the research of 2291 samples of copromaterial of children with acute intestinal infection was carried out. Human enteroviruses were found in 12,1% cases (6,8-18,3%). In 7,6% cases of viral gastroenteritis monoenterovirus infection was found. Enteroviruses of genogroup I were detected in 43,9%, enteroviruses of genogroup II were found in 37,1%, double infection by enteroviruses of genogroups I and II - 9,4%. In 2006 the distribution of the strains ЭВ1:ЭВII:ЭВ1+II was as follows 20%:52,3%:13,8% (n=65), in 2007 - 50%:37%:8,4% (n=143), in 2008 г. - 54,3%:22,9%:7,1% (n=70). We found enteroviruses of A-type (Coxsackie A2 and A16), enteroviruses of B-type (Coxsackie A9 and ECHO16) and enteroviruses of C-type (Coxsackie virus A22) at children with acute gastroenteritis. Enteroviruses of A-type were at children with acute gastroenteritis in N.Novgorod for the first time.

**Key words:** human enteroviruses, PCR-method, genome sequestration, nucleotide sequence, isolate.

### Введение

Энтеровирусы человека (род Enterovirus, сем. Picornaviridae) являются мелкими безоболочечными РНК-содержащими вирусами. На основании молекулярно-биологических свойств энтеровирусы человека делят на 4 вида: А, В, С, D [www.Picornaviridae.com]. При анализе нуклеотидной последовательности 5'-НТР генома энтеровирусы были разделены на 2 геногруппы. В первую (I) входят вирусы вида А (вирусы Коксаки А 2-8, 10, 12, 14, 16 и энтеровирус 71, 76, 89-91) и В (вирусы Коксаки А 9, В 1-6; все ЕСНО; энтеровирус 69, 73-75, 77-88, 95, 97, 100), а во вторую (II) – вирусы вида С (полиовирусы 1-3, вирусы Коксаки А 1, 11, 13, 15, 17-22, 24; ЕСНО 34; энтеровирус 96) и D (энтеровирусы 68, 70, 94) [1, 2]. Энтеровирусы человека распространены повсеместно, их резервуаром может служить как больной человек, так и здоровый вирусоноситель, и они способны вызывать заболева-

ния, различающиеся по клиническим проявлениям и тяжести течения: от бессимптомного носительства до тяжелых заболеваний, таких как полиомиелит, серозный менингит и энцефалит, геморрагический конъюнктивит, параличи и т. д. Однако до сих пор связь энтеровирусов с острым гастроэнтеритом (ОГЭ) остается до конца не изученной. На сегодняшний день известно, что при энтеровирусных диареях наиболее доказана этиологическая роль вирусов Коксаки А 18, 20, 21, 24 и ЕСНО 6, 11, 14, 18, 19 [3, 4, 5, 6]. Все эти вирусы в разное время были идентифицированы как причина вспышек кишечных заболеваний. Все вышеизложенное определяет актуальность определения спектра и молекулярно-генетических свойств энтеровирусов, обнаруживаемых у больных детей ОГЭ.

**Цель исследования:** молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов, выявленных у детей с гастроэнтеритом.

### Материалы и методы исследований

Материалом для исследования служили фекалии детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ), госпитализированных в инфекционный стационар г. Н. Новгорода в 2006-2008 гг. РНК энтеровирусов для постановки ОТ-ПЦР выделяли с помощью комплекта реагентов Рибосорб согласно инструкции (ЦНИИЭ, г. Москва). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием ревертазы М-МЛV и гекса праймеров (НПАО «Силекс», г. Москва). Для выявления и одновременной дифференциации энтеровирусов на геногруппы по 5'-НТР генома применили лабораторный вариант метода ОТ-ПЦР [7]. Для определения вида и серотипа выявленных энтеровирусов методом частичного секвенирования генома использовали универсальные для всех энтеровирусов праймеры, предложенные Nix с соавт. [8].

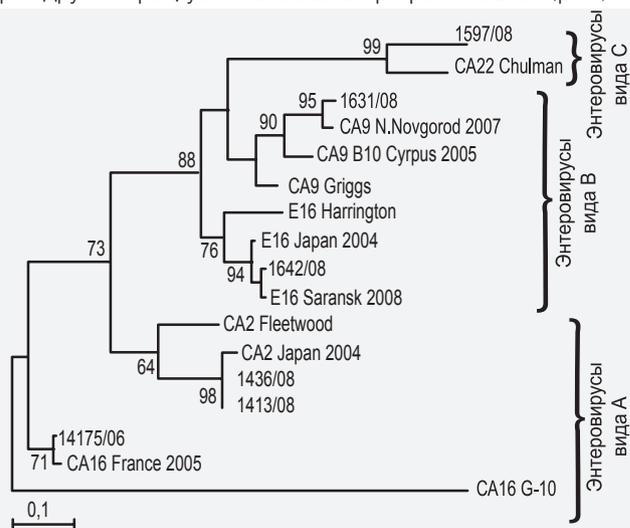
### Результаты и их обсуждение

За период 2006-2008 гг. было проведено исследование 2291 образца копроматериала детей с ОКИ. Энтеровирусы человека были обнаружены в 278 случаях, что составило 12,1% от числа обследованных. Частота обнаружения энтеровирусов в разные сезоны 2006-2008 гг. колебалась от 6,8 до 18,3%. Наши результаты согласуются с результатами, полученными в других странах, где частота обнаружения энтеровирусов у детей с острым гастроэнтеритом колебалась от 9 до 19,6% [9, 10, 11, 12]. Проведена дифференциация выявленных энтеровирусов (278 изолятов) по 5'-НТР генома. Энтеровирусы геногруппы I были выявлены в 43,9%, в 37,1% обнаружены энтеровирусы геногруппы II, в 9,4% случаев было выявлено двойное инфицирование энтеровирусами геногрупп I и II. Установлено, что в 2006 г. распределение штаммов ЭВI:ЭВII:ЭВI+II было 20%:52,3%:13,8% (n=65), в 2007 г. – 50%:37%:8,4% (n=143), а в 2008 г. – 54,3%:22,9%:7,1% (n=70) (табл.). Таким образом, наблюдалась смена доминирования энтеровирусов геногруппы II ( $52,3 \pm 6,2\% \rightarrow 37,0 \pm 4,0\%$ ;  $p < 0,05$ ) на энтеровирусы геногруппы I ( $20,0 \pm 5,0\% \rightarrow 50,0 \pm 4,2\%$ ;  $p < 0,001$ ), которые активно циркулировали и в 2008 г. Следует отметить, что в 2006-2008 гг. в 7,6% случаев вирусных гастроэнтеритов была зафиксирована моноэнтеровирусная инфекция, что не только подтверждает способность энтеровирусов вызывать диарейные заболевания, но и указывает на причину ОГЭ у обследованных пациентов.

С целью молекулярно-генетической характеристики выявленных энтеровирусов с использованием метода частичного секвенирования генома были определены нуклеотидные последовательности 6 изолятов энтеровирусов в области генома, кодирующей VP1. Путем сравнительного анализа в программе BLAST установлено, что 2 последовательности фрагмента гена VP1 идентичны нуклеотидным последовательностям генома вирусов Коксаки А2, остальные изоляты были типированы как вирусы Коксаки А9, А16, А22 и ЕСНО16. Таким образом, у детей с ОГЭ мы обнаружили энтеровирусы вида А (3 изолята), энтеровирусы вида В (2 изолята) и энтеровирусы вида С (1 изолят). Известно, что наиболее часто при ОГЭ идентифицируются энтеровирусы вида В и С [3, 4, 5, 6], поэтому интересным является наличие в выборке энтеровирусов вида А.

Вирусы этого вида обнаружены в Нижнем Новгороде впервые. Энтеровирусы Коксаки А2 и А16 были выявлены у детей разного возраста с диагнозом ОКИ, при этом других кишечных вирусных агентов найдено не было.

Установленные нуклеотидные последовательности использовали для проведения филогенетического анализа выявленных изолятов с последовательностями референтных штаммов, представленными в GenBank, а также с последовательностями их ближайших родственников, циркулирующих на территории других стран, установленных в программе BLAST (рис.).



**РИС.** Филограмма, построенная на основе фрагмента гена VP1 (375 п.н.) референтных штаммов энтеровирусов, родственных штаммов и нижегородских изолятов, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом. Указаны индексы поддержки >60. Нижегородские изоляты энтеровирусов отмечены жирным шрифтом.

При сравнении нуклеотидных последовательностей двух нижегородских изолятов Коксаки А2 (энтеровирусы вида А) был определен уровень их гомологии, который составил 99%, что позволяет сделать вывод об их генетическом единстве. При филогенетическом анализе данных изолятов с прототипным штаммом Коксаки А2 Fleetwood, выделенным в 1947 г. в США Daldorf и Sickles от больного полиомиелитом, было установлено, что они дивергировали от прототипного штамма на 20% в анализируемой области генома. При сравнении аминокислотных последовательностей уровень дивергенции составил 4,5%. Выявленные нами изоляты Коксаки А2 проявили филогенетическое родство со штаммом вируса Коксаки А2, выделенным в 2004 г. в Японии от ребенка с респираторным заболеванием, и отличались от него на 8,9% при анализе нуклеотидных последовательностей и на 3,6% при сравнении аминокислотных последовательностей.

При анализе другого изолята энтеровируса вида А, типированного как Коксаки А16, с прототипным штаммом G-10, выделенным при бессимптомной инфекции в 1951 г. в Южной Африке Sickles и Poyry, было выявлено, что данный изолят дивергировал от прототипного штамма на 23% при сравнении нуклеотидных последовательностей. При анализе аминокислотных последовательностей уровень дивергенции составил

2,8%. Нижегородский изолят Коксаки А16 проявил филогенетическое родство с вирусом Коксаки А16, выделенным во Франции в 2005 г. от больного с респираторным заболеванием, уровень их гомологии составил 98% при сравнении нуклеотидных последовательностей и 99% при анализе аминокислотных последовательностей.

#### ТАБЛИЦА.

**Обнаружение и дифференциация энтеровирусов у детей с гастроэнтеритом**

Год	Количество обследованных детей, абс.	Количество выявленных энтеровирусов, %		
		Энтеровирусы I геногруппы	Энтеровирусы II геногруппы	Энтеровирусы I+II геногрупп
2006	481	20,0±5,0	52,3±6,2	13,8±4,3
2007	781	50,0±4,2	37,0±4,0	8,4±2,3
2008	1029	54,3±6,0	22,9±5,0	7,1±3,1

При филогенетическом анализе одного из нижегородских изолятов энтеровируса вида В, типированного как вирус Коксаки А9, с прототипным штаммом Griggs, выделенным в США в 1955 г., было установлено, что данный изолят дивергировал от прототипного штамма на 25% в анализируемой области генома. При сравнении аминокислотных последовательностей уровень дивергенции составил 7,3%. Нижегородский изолят вируса Коксаки А9 проявил филогенетическое родство со штаммом В10 вируса Коксаки А9, выделенного на Кипре в 2005 г. из сточных вод, и отличался от него на 12% при анализе нуклеотидных последовательностей и на 4% при сравнении аминокислотных последовательностей. При сопоставлении данного изолята с другим нижегородским изолятом вируса Коксаки А9, который был выделен от больного ребенка в 2007 г. во время подъема заболеваемости серозным менингитом, было установлено их генетическое родство. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей данных нижегородских изолятов составил 94%.

При филогенетическом анализе другого изолята энтеровируса вида В, типированного как вирус ЕСНО16, с прототипным штаммом Harrington, выделенным в 1951 г. в США Kibrick и Enders от больного серозным менингитом, было установлено, что данный изолят дивергировал от прототипного на 20% в анализируемой области генома. При сравнении аминокислотных последовательностей уровень дивергенции составил 1,7%. Выявленный изолят вируса ЕСНО16 проявил филогенетическое родство со штаммом вируса ЕСНО16, циркулирующего в Японии в 2004 г., уровень их гомологии составил 94,4% при анализе нуклеотидных последовательностей и 100% при сравнении аминокислотных последовательностей. При сравнении нуклеотидных последовательностей генома данного изолята и вируса ЕСНО16, обнаруженного у больного ребенка в 2008 г. во время подъема заболеваемости серозным менингитом в г. Саранске, был установлен уровень гомологии, равный 98%, что говорит об их генетическом родстве.

При филогенетическом анализе изолята энтеровируса геногруппы С, типированного как вирус Коксаки А22, с прототипным

штаммом вируса Коксаки А22 Chulman, выделенным в 1955 г. в США Sickles от больного гастроэнтеритом, и единственным из современных штаммов вируса Коксаки А22, чья нуклеотидная последовательность, представлена в базе данных, выделенного от больного с острым вялым параличом в г. Бангладеш в 1999 г., было установлено, что нижегородский изолят был филогенетически ближе прототипному штамму. При этом изолят 1597/08 дивергировал от Коксаки А22 Chulman на 28% в анализируемой области генома. При сравнении аминокислотных последовательностей уровень дивергенции составил 16%.

#### Выводы

1. На большой выборке обследуемых установлена частота обнаружения энтеровирусов человека у детей, госпитализированных с ОКИ в Нижнем Новгороде, которая составила в среднем 12,1% (6,8-18,3%).

2. В 7,6% случаев вирусных гастроэнтеритов была зафиксирована моноэнтеровирусная инфекция.

3. Установлена достоверная смена доминирования энтеровирусов геногруппы II (2006-2007 гг.) на энтеровирусы геногруппы I (2007-2008 гг.).

4. Показана выраженная гетерогенность нижегородской популяции энтеровирусов человека, выявленных у детей с гастроэнтеритом, которая в 2006-2008 гг. была представлена энтеровирусами вида А, В и С.

5. Энтеровирусы вида А у детей с гастроэнтеритом обнаружены в Нижнем Новгороде впервые.



#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hyypia T., Hovi T., Knowles N., Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J. Gen. Virol., 1997. V. 78. P. 1-11.
2. Oberste M., Maher K., Pallansch M.A. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences of the 5' and of the region encoding VP2. Virus. Res., 1998. V. 58. P. 35-43.
3. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека. М.: Медицина, 1979. 360 с.
4. Златковская Н.М. Энтеровирусные заболевания у детей. М.: Медицина, 1976. 192 с.
5. Экология энтеровирусов /Под ред. Бондаренко В.И., Гирин В.Н., Григорьева Л.В. и др. К.: Здоровья, 1988. 168 с.
6. Abe O., Kimura H., Minakami H. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan. J. Infect., 2000. V. 41, № 3. P. 285-286.
7. Голицына Л.Н., Новикова Н.А., Домбровская Л.К., Княгина О.Н., Новиков Д.В., Аркова Т.В. Оценка разработанного «nested»-варианта полимеразной цепной реакции при выявлении энтеровирусов у больных. Вопросы вирусологии, 2002. Т. 5. С. 41-43.
8. 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. J. of Clinical microbiology, 2006. V. 44. № 8. P. 2698-2704.
9. Enterovirusinfeksjoner diagnostisert i Midt-Norge i perioden 1992-2001. In Medisin og vitenskap, 2003. № 123. P. 3180-3183.
10. Phan T.G., Nguyen T.A., Shimizu H., Yagyu F., Okitsu S., Miller W.E., Ushijima H. Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J. Med. Virol., 2005. V. 77. № 2. P. 257-264.
11. Silva P.A., Stark K., Mockenhaupt F.P., Reither K., Weitzel T., Ignatius R., Saad E., Seidu-Korkor A., Bienzle U., Schreiber E. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. J. Med. Virol., 2008. V. 80. P. 1790-1798.
12. Stanway G., Joki-Korpela P., Hyypia T. Human parechoviruses – biology and clinical significance. Med. Virol., 2000. V. 10. № 1. P. 57-69. 3180-3.