

### III РАЗДЕЛ. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА РАЗЛИЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ И НЕИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

УДК 61:575:578.7

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ВИДА А

Л.Н. Голицына<sup>1</sup>, С.Г. Фомина<sup>1</sup>, О.В. Парфенова<sup>1</sup>, Н.А. Калашникова<sup>2</sup>, Н.А. Новикова<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»,

<sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Нижегородской области», г. Н. Новгород

Голицына Людмила Николаевна – e-mail: mevifc@rambler.ru

В настоящей работе был изучен пейзаж энтеровирусов вида А, идентифицированных у больных с различными формами проявления энтеровирусной инфекции. Дана молекулярно-генетическая характеристика вирусов Коксаки А6 и Коксаки А5, вызвавших в 2011–2012 гг. вспышки ОРВИ, герпангины и ящуроподобного заболевания, исследованы их филогенетические взаимосвязи.

**Ключевые слова:** энтеровирус А, герпангина, ящуроподобное заболевание, филогенетический анализ.

In this we studied the landscape Enterovirus A, identified in patients with various manifestations of enterovirus infection. We given the molecular genetic characteristics of the virus Coxsackie A6 and Coxsackie A5 caused in 2011–2012 outbreaks of acute respiratory infection, herpangina and HFMD, and investigated their phylogenetic relationships.

**Key words:** Enterovirus A, herpangina, HFMD, phylogenetic analysis.

Энтеровирусы (род. Enterovirus, сем. Picornaviridae) способны вызывать заболевания с разнообразными клиническими проявлениями. Многие заболевания энтеровирусной природы склонны к эпидемическому распространению. При этом особое значение имеют возникающие энтеровирусные инфекции (ЭВИ), обладающие пандемическим потенциалом (за последние 100 лет это были полиомиелит, ящуроподобное заболевание, связанное с инфекцией энтеровируса 71 (ЭВ71) и геморрагический конъюнктивит) [1]. Значимость ЭВИ в инфекционной патологии человека определяет актуальность её мониторинга, изучения молекулярной биологии и эволюции энтеровирусов.

В настоящее время различают более 100 типов энтеровирусов человека 4 видов: энтеровирус А-D [<http://www.picornaviridae.com>].

В странах Европы и США наибольшее количество диагностированных случаев sporadic и групповой заболеваемости ЭВИ было связано с представителями вида энтеровирус В: вирусы ЕСНО 30, ЕСНО 6, ЕСНО 9, Коксаки В5, Коксаки А9, ЕСНО 13, ЕСНО 11, ЕСНО 7; при этом чаще других проявлений ЭВИ регистрировался серозный менингит [2–6].

В странах Юго-Восточной Азии и Тихоокеанского региона, где заболеваемость ЭВИ обычно выше, чем в европейских странах, среди циркулирующих энтеровирусов преобладают вирусы вида энтеровирус А (вирусы Коксаки А16, ЭВ71, Коксаки А2, 4–6, 10), а ЭВИ чаще регистрируется в форме ящуроподобного заболевания, герпангины, респираторных заболеваний [7, 8].

Последние 15 лет в Европе различные представители вида энтеровирус А sporadически выявляются у больных с разными проявлениями ЭВИ, здоровых и объектах окружающей среды [6, 9–11]. Вспышки ЭВИ, протекавшей в виде ящуроподобного синдрома и герпангины, были зарегистрированы в ряде европейских стран в 2008 г. и в 2010 г. [12–14]. У забо-

левших выявлялись преимущественно вирусы Коксаки А6 и Коксаки А10, реже – вирус Коксаки А16, ЭВ71 и другие энтеровирусы.

**Цель работы:** молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов вида А, обусловивших подъем sporadic и групповой заболеваемости ЭВИ в Нижегородской области и ряде регионов России в 2010–2012 гг.

#### Материалы и методы

Анализ проводился на основе выборки 175 энтеровирусов, идентифицированных в пробах биоматериала от больных ОРВИ и ОКИ, госпитализированных в инфекционные стационары Нижнего Новгорода и Нижегородской области в 2010–2012 гг. Определение типа энтеровирусов проводили методами частичного секвенирования области VP1 генома [15]. Результаты генотипирования ЭВ (161 штамм) были дополнены результатами клонирования классических вирусологических исследований на культурах клеток RD и Herp-2 (14 штаммов).

Полученные в результате данной работы нуклеотидные последовательности энтеровирусов доступны в базе данных GenBank под номерами: JX139781 – JX139786, JX139811.

Для филогенетического анализа дополнительно использовались нуклеотидные последовательности энтеровирусов, полученные нами в результате мониторинга ЭВИ в Нижнем Новгороде и других субъектах РФ в 2007–2012 гг. (работа проводилась при тесном взаимодействии с Управлениями Роспотребнадзора и Центрами гигиены и эпидемиологии в Калининградской, Ивановской, Пензенской, Ростовской областях, Ставропольском крае, Республике Мордовия, Республике Марий Эл, Удмуртской Республике) [16, 17], а также последовательности энтеровирусов, идентифицированные зарубежными исследователями (номера GenBank указаны на рисунках).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с использованием

программного обеспечения MEGA 5.0 [18]. Филогенетические деревья были построены по алгоритму neighbor-joining с опциями maximum composite likelihood, проанализировано по 100 псевдорепликатов.

Данные заболеваемости ЭВИ были предоставлены Управлением Роспотребнадзора по Нижегородской области.

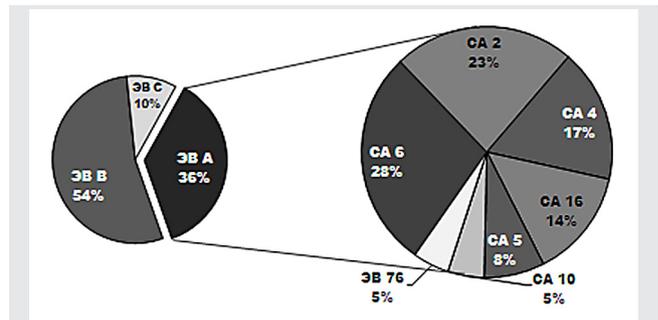
**Результаты и их обсуждение**

Серозный менингит является наиболее частой формой ЭВИ, требующей госпитализации. Вызывается энтеровирусный менингит преимущественно представителями вида энтеровирус В: ЕСНО30, ЕСНО6, ЕСНО9, ЕСНО11, ЕСНО13, Коксаки В5, Коксаки А9 [1–6]. В проведенных ранее исследованиях были изучены некоторые особенности молекулярной эпидемиологии вирусов ЕСНО30, ЕСНО9, Коксаки А9, ЕСНО6, обусловивших в последние годы подъем заболеваемости серозного менингита в Нижегородской области и ряде регионов России в 2007–2011 гг. Было показано, что эти вирусы обладали генетической гетерогенностью. Наибольшую вариабельность проявил вирус ЕСНО 6, у которого в рамках проведенных исследований было идентифицировано без явного доминирования 8 генотипов, у остальных возбудителей серозного менингита при наличии одного доминирующего наблюдались еще 1–2 генотипа. Штаммы доминирующего вируса ЕСНО30 и некоторые варианты ЕСНО6 имели близкое генетическое родство с вирусами, широко циркулировавшими в мире. Доминировавшие варианты вирусов ЕСНО9 и Коксаки А9 сформировались, по всей видимости, на территории России [16, 19, 20].

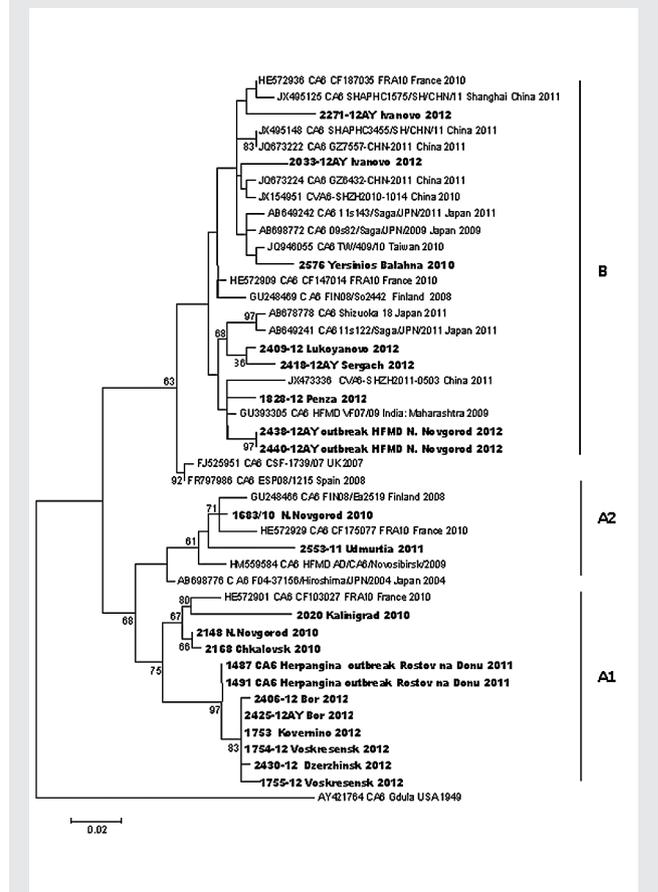
В результате анализа заболеваемости ЭВИ в Нижегородской области в 2003–2012 гг. было установлено, что доля серозных менингитов в структуре всех форм ЭВИ варьировала в разные годы и снизилась до уровня менее 50% в 2010–2012 гг. В этот период преобладали легкие формы ЭВИ с респираторными и гастроэнтерологическими проявлениями. При изучении пейзажа энтеровирусов, идентифицированных у больных этими формами ЭВИ, была установлена значительная доля (36%) вида энтеровирус А, который был представлен вирусами 8 типов: Коксаки А2, 4–6, 10, 16, ЭВ76 (рис. 1), при этом вирусы Коксаки А2 и Коксаки А6 вошли в число 3 доминирующих типов энтеровирусов, выявленных при анализе спорадической заболеваемости всеми формами ЭВИ в 2011 и 2012 гг., соответственно. В результате проведенного ранее анализа видового и серотипового распределения непوليوмиелитных энтеровирусов (n=767), циркулирующих среди населения Приволжского федерального округа, также было показано значительное представительство энтеровирусов вида А (10%, 8 типов) [16].

В 2011 и 2012 гг. в Нижнем Новгороде в детских дошкольных учреждениях имели место 2 случая групповых заболеваний ЭВИ, связанных с энтеровирусами вида А. В 2011 г. (вспышка ОРВИ) нами был идентифицирован вирус Коксаки А5, в 2012 г. (вспышка ящуроподобного заболевания) – вирус Коксаки А6.

По литературным данным до 2008 г. вирус Коксаки А6 был распространен преимущественно в странах Юго-Восточной Азии и входил в число вирусов, наиболее часто выявляющихся при спорадической заболеваемости герпангиной и ящуроподобным синдромом [7, 8, 20]. В европейских странах этот вирус, так же, как и другие представители вида энтеровируса А, относительно редко выявлялся у больных [2, 5,

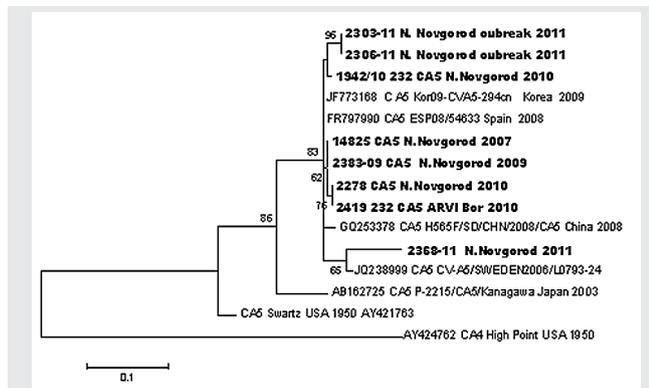


**РИС. 1.** Пейзаж энтеровирусов А, идентифицированных у больных ЭВИ с респираторными и гастроэнтерологическими проявлениями.



**РИС. 2.** Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагмента области VP1 генома российских и зарубежных штаммов вируса Коксаки А6.

6, 9, 10], однако составил значительную долю (10,5%) энтеровирусов, идентифицированных у здоровых детей [11]. В последние годы по всему миру регистрировались вспышки ящуроподобного заболевания, связанного с вирусом Коксаки А6 или одновременно вирусами Коксаки А6 и Коксаки А10: в 2008 г. – в Сингапуре [22], Финляндии и Испании [12, 13], в 2010 г. – во Франции и на Тайване [14, 23], в 2011 г. – в Японии [24], в 2012 г. – в США [25]. Заболевание, вызванное вирусами Коксаки А6 и Коксаки А10, протекало, как правило, доброкачественно, а доля неврологических осложнений была существенно ниже, чем при инфекции ЭВ71 [26]. В России вирус Коксаки А6 был выявлен новосибирскими



**РИС. 3.**  
Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагмента области VP1 генома российских и зарубежных штаммов вируса Коксаки А5.

учеными у больного ящуроподобным заболеванием в 2008 г. (нуклеотидная последовательность доступна в базе данных под номером HM559584). Помимо вспышки ящуроподобного заболевания в Нижнем Новгороде в 2012 г., вирус этого типа был идентифицирован нами прежде, при изучении вспышки герпангины в Ростовской области в 2011 г. При мониторинге спорадической заболеваемости ЭВИ вирус Коксаки А6 выявлялся на ряде территорий России в 2010–2012 гг. у больных с различными диагнозами: в Нижнем Новгороде и Нижегородской области – у больных ОКИ, ОРВИ и ЭВИ, в Калининграде – у больного герпангиной, в Удмуртии – у больного ЭВИ, в Иваново – у больных герпангиной и ЭВИ.

Как отмечалось, за рубежом часто наблюдалась коциркуляция (в том числе и при вспышках) вирусов Коксаки А6 и А10 [12–14, 22, 26]. В нашем исследовании вирус Коксаки А10 идентифицировался у больных ОРВИ, ОКИ, герпангиной только при спорадической заболеваемости и значительно реже, чем вирус Коксаки А6. Кроме Нижегородской области вирус Коксаки А10 был выявлен в Республике Мордовия в 2009 г., в Республике Марий Эл в 2010 г., в Ставропольском крае в 2012 г.

Идентифицированные нами в 2010–2012 гг. вирусы Коксаки А6 распределились по двум филогенетическим группам, условно А и В (рис. 2). Дивергенция нуклеотидных последовательностей вирусов, вошедших в разные группы, составляла не менее 9%. Гомология нуклеотидных последовательностей вирусов группы А1 была не менее 94%, группы А2 – не менее 96%. В группе А наблюдалось 2 субкластера: А1 и А2.

Вирус Коксаки А6, вызвавший вспышку герпангины в Ростовской области, образовал монофилетическую группу с вирусами Коксаки А6, циркулировавшими в Нижегородской области в 2012 г. Вместе со штаммами Коксаки А6, идентифицированными в 2010 г. в Калининграде и Нижегородской области, и вирусом Коксаки А6, выявленным при изучении вспышки ящуроподобного заболевания/герпангины в том же году во Франции, они сформировали субкластер А1. Гомология нуклеотидных последовательностей ростовских и нижегородских штаммов Коксаки А6, вошедших в этот субкластер (96,5–98,5%), была выше, чем с последовательностями французского вируса (96%). Калининградский вирус Коксаки А6, напротив, проявил более высокое родство с французским штаммом. Вирусы Коксаки А6, идентифициро-

ванные в других странах, проявили меньшее родство с этой группой российских вирусов и распределились по другим филогенетическим кластерам. Российские вирусы, вошедшие в субкластер А2, также проявили более высокое родство с современными европейскими штаммами.

Вирус Коксаки А6, ставший причиной вспышки ящуроподобного заболевания в Нижнем Новгороде в 2012 г., вместе с вирусами Коксаки А6, идентифицированными в том же году в Иваново, Пензе, некоторых районах Нижегородской области и в 2010 г. – в Балахнинском районе, вошли в филогенетическую группу В. В отличие от филогенетической группы А, она была широко представлена зарубежными штаммами Коксаки А6, выявленными в течение последних 5 лет при групповой и вспышечной заболеваемости как в европейских странах (Великобритания, Финляндия, Испания, Франция), так и в странах Юго-Восточной Азии (Япония, Индия, Тайвань, Китай).

По данным зарубежных исследователей вирус Коксаки А5, выявлявшийся чаще всего у больных ОРВИ, реже – при герпангине и ящуроподобном синдроме, менее распространен, чем вирус Коксаки А6 [7, 8, 13]. В Нижнем Новгороде и Нижегородской области этот вирус спорадически определялся у больных ОРВИ и ОКИ в 2007, 2009–2012 гг. В отличие от Коксаки А6, на других территориях России вирус Коксаки А5 нами не идентифицировался. Все выявленные вирусы Коксаки А5 образовали филогенетическую группу с вирусами Коксаки А5, циркулировавшими в Европе, Корею и Китае в 2006–2009 гг. (рис. 3). Гомология нуклеотидных последовательностей вирусов Коксаки А5, вошедших в эту группу, составила (94–99%). Штаммы вируса Коксаки А5, выявленные при расшифровке группового заболевания в Нижнем Новгороде в 2011 г., проявили родство со штаммом 1942/10, идентифицированным в Нижнем Новгороде у больного ОКИ в 2010 г. Гомология нуклеотидных последовательностей вируса, вызвавшего вспышку, с последовательностями штамма 1942/10 составила 99%, с последовательностями других штаммов этой группы – не превышала 97%.

### Заключение

Проведенный анализ указывает на значительное представительство вида энтеровирус А в структуре энтеровирусов, циркулирующих в настоящее время среди населения России.

В результате филогенетического анализа штаммов вирусов Коксаки А6 и Коксаки А5, идентифицированных нами при изучении вспышек и спорадической заболеваемости ЭВИ с различными клиническими проявлениями, было установлено, что эти вирусы, так же, как основные возбудители энтеровирусного менингита, характеризуются генетической гетерогенностью. Среди них присутствуют как варианты, имеющие близкое родство с вирусами, получившими широкое распространение в разных странах (штаммы вируса Коксаки А6 группы В и вируса Коксаки А5), так и варианты, циркулирующие, по видимому, локально (штаммы вируса Коксаки А6 группы А1).



### ЛИТЕРАТУРА

1. Лукашев А.Н., Иванова О.Е., Худякова Л.В. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и её роль в структуре инфекционной патологии в мире. Журн. микробиол. 2010. № 5. С. 113–120.
2. Antona D., Leveque N., Chomel J.J. et al. Surveillance of enterovirus in France, 2000–2004. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2007. Vol. 26. P. 403–412.

3. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Enterovirus surveillance United States, 1970-2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2006. Vol. 55. P. 1-20.
4. Nonpolio Enterovirus and human Parechovirus Surveillance – United States, 2006-2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2010. Vol. 59. P. 1577-1580.
5. Roth B., Enders M., Arents A. et. al. Epidemiologic aspects and laboratory features of enterovirus infections in Western Germany, 2000-2005. *J. Med. Virol.* 2007. Vol. 79. P. 956-962.
6. Trallero G., Avellon A., Otero A. et. al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J. Clin. Virol.* 2010. Vol. 47. P. 170-176.
7. Momoki T.S. Surveillance of enterovirus infections in Yokohama city from 2004 to 2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009. 62. P. 471-473.
8. Tsao K.C., Huang C.G., Huang Y.L. et.al. Epidemiologic features and virus isolation of enteroviruses in Northern Taiwan during 2000-2008. *J. Virol. Meth.* 2010. Vol. 165. P. 330-332.
9. Blomqvist S., Paananen A., Salovainien-Kopra C. et.al. Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46. P. 2410-2413.
10. Jacques J., Moret H., Minette B. et.al. Epidemiological, molecular and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46. P. 206-213.
11. Witso E., Palacios G., Cinek O. High prevalence of Human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2006. Vol. 44. P. 4095-4100.
12. Blomqvist S., Klemola P., Kajjalainen S. et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J. Clin. Virol.* 2010. Vol. 48. P. 49-54.
13. Bracho M.A., Gonza'lez-Candelas F., Valero A. et al. Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2011. Vol. 17. P. 2223-2231.
14. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Ughetto S., Antona D. et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. Vol. 18. P. 110-118.
15. 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. Clin. Microbiol.* 2006. Vol. 44. P. 2698-2704.
16. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г. Ефимов Е.И. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на территории России в 2008-2011 г. *Журн. микробиол.* 2013. № 1. С. 75-78.
17. Фомина С.Г., Голицына Л.Н., Новикова Н.А. и др. Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде. *Медицинский альманах.* 2009. № 2. С. 121-123.
18. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et.al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. and Evol.* 2011. Vol. 28. P. 2731-2739.
19. Онищенко Г.Г., Новикова Н.А., Ефимов Е.И. и др. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Н. Новгороде в 2007 году: молекулярно-эпидемиологические аспекты. *Журн. микробиол.* 2009. № 2. С. 24-30.
20. Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Новикова Н.А. и др. Молекулярно-генетические варианты вируса ЕСНО 9, идентифицированные у больных серозным менингитом в России в 2007-2009 гг. *Вопр. вирусол.* 2011. № 6. С. 37-42.
21. Chen Y.J., Chang S.C., Tsao K.C. et.al. Comparative genomic analysis of Coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities. *PLoS ONE.* 2012. № 7 (12): e52432. doi:10.1371/journal.pone.0052432.
22. Wu Y., Yeo A., Phoon M.C. et al. The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int. J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 14. P. 1076-1081.
23. Wei S.H., Huang Y.P., Liu M.C. et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infect. Dis.* 2011. Vol. 11. P. 346.
24. Fujimoto T., Iizuka S., Enomoto M. et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2012. Vol. 18. P. 337-339.
25. Severe hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 - Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011-February 2012. *MMWR. Notes from the field.* 2012. Vol. 61. P. 213-214.
26. Lu Q.B., Zhang X.A., Wo Y. et.al. Circulation of coxsackievirus A10 and A6 in Hand-Foot-Mouth Disease in China, 2009-2011.