

Н. В. Поклонская¹, Т. В. Амвросьева¹, С. К. Лозюк¹, Ю. А. Шилова¹,
З. Ф. Богущ¹, Н. М. Бискина²

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь

²Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ТЯЖЕЛЫЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ

Аннотация. Представленная работа посвящена анализу результатов молекулярно-эпидемиологических исследований наблюдаемой в 2016 г. заболеваемости тяжелыми неврологическими формами энтеровирусной инфекции (ЭВИ) в отдельных регионах Республики Беларусь.

Установлено, что основным этиологическим агентом подъема заболеваемости неврологическими формами ЭВИ в Минске и Гомельской области в 2016 г. были вирусы ЕСНО 9. Анализ нуклеотидных последовательностей идентифицированных изолятов ЕСНО 9 показал их значительную генетическую гетерогенность. Филогенетическая реконструкция позволила установить принадлежность исследуемых изолятов к трем различным геногруппам и четырем геновариантам. Две из трех геногрупп ЕСНО 9 (L и K) ранее описаны не были, а циркуляция геногруппы ω не обнаруживалась на территории Евразии до начала настоящих исследований.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли молекулярно-эпидемиологических исследований в системе надзора за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов.

Ключевые слова: энтеровирус, молекулярная эпидемиология, ЕСНО 9, энтеровирусный менингит, эпидемиологический надзор.

Для цитирования: Молекулярная эпидемиология энтеровирусов, вызывающих тяжелые неврологические формы инфекции / Н. В. Поклонская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 3. – С. 29–36.

N. V. Paklonskaya¹, T. V. Amvrosieva¹, S. K. Lozuk¹, Y. A. Shilova¹, Z. F. Bogush¹, N. M. Biskina²

¹Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ENTEROVIRUSES CAUSING SEVERE NEUROLOGICAL INFECTION FORMS

Abstract. The study analyzes the molecular epidemiology of enteroviruses that caused severe neurologic forms of infection in Belarus in 2016.

The obtained results showed the predominating role of Echovirus 9 among the etiologic agents of enteroviral meningitis in 2016. The identified isolates of ECHO 9 revealed significant genetic heterogeneity: they belonged to 3 different genogroups and 4 genovariants. Two of the three genogroups of Echovirus 9 (L and K) were not previously described, and the circulation of the genogroup ω in Eurasia was not previously registered.

The results testify to the important role of molecular epidemiology in the surveillance system of non-polio enteroviruses.

Keywords: enterovirus, molecular epidemiology, human echovirus 9, enteroviral meningitis, epidemiological surveillance.

For citation: Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Lozuk S. K., Shilova Y. A., Bogush Z. F., Biskina N. M. Molecular epidemiology of enteroviruses causing severe neurological infection forms. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 29–36 (in Russian).

Введение. Энтеровирусы (род *Enterovirus*) – большая группа патогенных для человека микроорганизмов, которые способны вызывать широкий спектр клинических форм, начиная от легких (летний грипп, гастроэнтерит, везикулярный фарингит) и заканчивая тяжелыми, угрожающими жизни пациента (менингит, гепатит, миокардит, сепсисоподобная инфекция новорожденных). Неврологические формы энтеровирусной инфекции (менингиты, менингоэнцефалиты, энцефалиты) являются наиболее распространенными среди тяжелых клинических проявлений [1].

В Республике Беларусь в течение многих лет проводится регулярный эпидемиологический надзор за энтеровирусными инфекциями (ЭВИ). В 2016 г. показатель заболеваемости ЭВИ составил 24,11 на 100 тыс. населения, что в 1,7 раза выше, чем в 2015 г. При этом на территории двух регионов наблюдался рост тяжелых нейроинфекций: в Гомельской области и г. Минске преобладающей клинической формой ЭВИ был энтеровирусный менингит (49,5 и 30,6 % соответственно).

Цель работы – анализ результатов проведенных молекулярно-эпидемиологических исследований наблюдаемой в 2016 г. заболеваемости тяжелыми неврологическими формами энтеровирусной инфекции в отдельных регионах Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования. Исследовано 126 проб спинномозговой жидкости (СМЖ) от пациентов с различными формами нейроинфекций, в том числе с августа по ноябрь – 59.

Детекцию энтеровирусов (ЭВ) в исследуемых пробах осуществляли методом ОТ-ПЦР с использованием наборов «Реверта», «Амплиценс® Enterovirus-FL» (Россия), «Тест-система для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР» (Республика Беларусь). РНК из проб выделяли с помощью набора «РИБО-преп» (Россия).

Для накопления фрагмента кДНК ЭВ и последующего секвенирования использовали комплект разработанных праймеров для гнездовой ПЦР, представленный в табл. 1. Первый раунд реакции (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора Script One Step RT-PCR Kit (JenaBioscience), второй – с применением реакционной смеси, содержащей 10 × ПЦР-буфер с с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 мМ MgCl_2 , смесь дНТФ (по 200 мкМ каждого), праймеры первого раунда – по 30 пмоль/реакцию, второго – по 40 пмоль/реакцию, 2,5 ед. Таq-полимеразы. Реакцию проводили в следующих условиях: первый раунд: обратная транскрипция при 50 °С, предденатурация при 95 °С – 5 мин, затем 40 циклов при 95 °С – 5 мин, при 53 °С – 45 с, при 72 °С – 1 мин; 2-й раунд: 40 циклов при 95 °С – 30 с, при 53 °С – 30 с, при 72 °С – 30 с.

Секвенирование ДНК проводили методом терминации цепи с последующим анализом на ДНК-анализаторе SEQ8000.

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагмента гена VP1 энтеровирусов вида enterovirus B

Table 1. Primers for the amplification of the fragment of the gene VP1 of enteroviruses B

Название	Последовательность 5'-3'	Ориентация	Локализация в геноме ECHO 30
NestVP1F1	garacdggicayacitcicargt	Прямой	2550 → 2573
NestVP1R1	ccicchgigggbayrtacat	Обратный	2877 ← 2897
NestVP1F2	gayamiatvcaracimgvcaygt	Прямой	2583 → 2606
NestVP1R2	gghggyayrtacatdakytgrtgdt	Обратный	2868 ← 2894

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [3]. Для компьютерного анализа последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) использовали программные продукты MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 6.0 [4] и BLAST 1.7 [5].

Результаты и их обсуждение. Как известно, для ЭВИ характерна летне-осенняя сезонность (июнь–ноябрь). В 2016 г. подъем заболеваемости ЭВИ в Республики Беларусь начался раньше обычного – с апреля, а показатели заболеваемости достигли максимума в сентябре–октябре. На этот же период пришелся и рост заболеваемости энтеровирусным менингитом.

В результате ПЦР-анализа 126 проб СМЖ от пациентов с нейроинфекциями присутствие ЭВ подтверждено в 33 (26,2 %) из них. В период подъема заболеваемости энтеровирусным менингитом (с августа по ноябрь) исследовано 59 проб, из них положительными оказалось 30 (50,8 %). Все пробы, для которых был получен положительный результат, использовали для выделения ЭВ на двух культурах чувствительных клеток (RD, Нер2с). Ни в одной из проб инфекционный ЭВ выделить не удалось. В связи с этим было проведено молекулярное типирование ЭВ, обнаруженных в пробах ликвора, по фрагменту гена *VP1*, которое осуществляли в соответствии с установленными ранее критериями, согласно которым изолят относится к тому типу вируса, с прототипным штаммом которого он имеет не более 25 % отличий в нуклеотидной последовательности основного капсидного белка [6].

В результате молекулярного типирования 22 изолятов ЭВ (66,7 % всех положительных образцов) установлено, что 13 (59,0 %) из них принадлежат к вирусу ЕСНО 9, 5 (22,7 %) – к вирусу ЕСНО 16, 2 (9,0 %) – к вирусу ЕСНО 6, по 1 (4,5 %) изоляту – к вирусам ЕСНО 19 и Коксаки А9. Следует отметить, что абсолютное большинство вирусов ЕСНО 9 идентифицировано в пробах пациентов из Гомельской области и г. Минска, где энтеровирусные менингиты преобладали в структуре клинических форм ЭВИ. По результатам молекулярного типирования установлено, что зарегистрированный подъем заболеваемости неврологическими формами ЭВИ обусловлен вирусом ЕСНО 9, который был преобладающим и обнаруживался в ликворе 57,1 % пациентов.

Далее были проведены генетический анализ и филогенетическая реконструкция полученных фрагментов нуклеотидных последовательностей идентифицированных вирусов ЕСНО 9. Результаты сравнения всех выявленных у пациентов вирусов ЕСНО 9 показали, что по степени сходства их нуклеотидных последовательностей можно выделить две группы и два изолята, которые не вошли ни в одну из этих групп (табл. 2).

Таблица 2. Группирование изолятов ЕСНО 9 на основании генетического анализа фрагмента гена основного капсидного белка

Table 2. Grouping of ЕСНО 9 isolates on the basis of the genetic analysis of the fragment of the basic capsid protein gene

Группа	Номера изолятов	Доля различий в группе, %	Доля различий с другими группами, %	Регион циркуляции
1	14645, 15244	1,0	17–19,5	Минск, Гомельская обл.
2	14996, 15014, 15231, 15232, 15242	1,5–4,0	12–19,5	Минск, Гомельская обл.
3	15241	–	8,5–18,5	Гомельская обл.
4	15237	–	8,0–19,0	Могилевская обл.

Из табл. 2 видно, что идентифицированные в 2016 г. изоляты ЕСНО 9 принадлежали к 4 различным геновариантам вируса.

Следует отметить, что вирус ЕСНО 9 ранее уже циркулировал на территории Беларуси (он был идентифицирован в пробах клинического материала от пациентов с серозным менингитом в 2013–2014 гг.). Сравнение нуклеотидных последовательностей этих вирусов с таковыми, выделенными в 2016 г., выявило различия между ними в 7,2–18,8 %.

Сравнение нуклеотидных последовательностей выявленных нами вирусов ЕСНО 9 с имеющимися в базе данных GenBank, не позволило обнаружить значительное количество изолятов, циркулировавших в других странах и обладавших существенной (более 95 %) степенью сходства с анализируемыми. Изолят № 15237 – единственный из всех исследуемых (табл. 2, группа 4) продемонстрировал значительную степень сходства (97 %) с вирусами, циркулировавшими в Российской Федерации (изоляты из Нижнего Новгорода и Калининграда, 2009 г.) [7]. Изоляты из группы 1 (табл. 2, № 14645 и № 15244) обладали максимальной степенью сходства (91,2–91,8 %) с вирусами 2002–2003 гг. из Бразилии и Аргентины. Аргентинский геновариант ЕСНО 9 идентифицирован как доминирующий возбудитель нейроинфекций у детей в 2002 г. Бразильский геновариант ЕСНО 9 включал вирусы, обнаруженные у детей с экзантемными формами ЭВИ и идентифицированные в рамках программы эпидемиологического надзора за этой группой инфекций [8, 9]. Изоляты из группы 2 (табл. 2, № 14996, 15014, 15231, 15232, 15242,) обнаруживали максимальное сходство (90,2–91,2 %) с вирусами ЕСНО 9, которые были зарегистрированы в Испании в 2003 г., Пакистане и Нидерландах в 2009 г. Изолят № 15241 (табл. 2, группа 3) имел максимальное сходство с вирусами ЕСНО 9, идентифицированными в Индии в 2009 г. в рамках этиологического расследования неполиомиелитных случаев острого вялого паралича, а также в Шри-Ланке в том же году при установлении этиологии острого менингоэнцефалита [10, 11].

Таким образом, сравнительный генетический анализ нуклеотидных последовательностей выявил значительное разнообразие среди вирусов ЕСНО 9, вызвавших неврологические формы ЭВИ в нашей стране в 2016 г., но не позволил в полной мере охарактеризовать отдельные изоляты и их группы. Исходя из этого, проведена филогенетическая реконструкция с использованием двух различных алгоритмов – более простого и широко используемого алгоритма присоединения ближай-

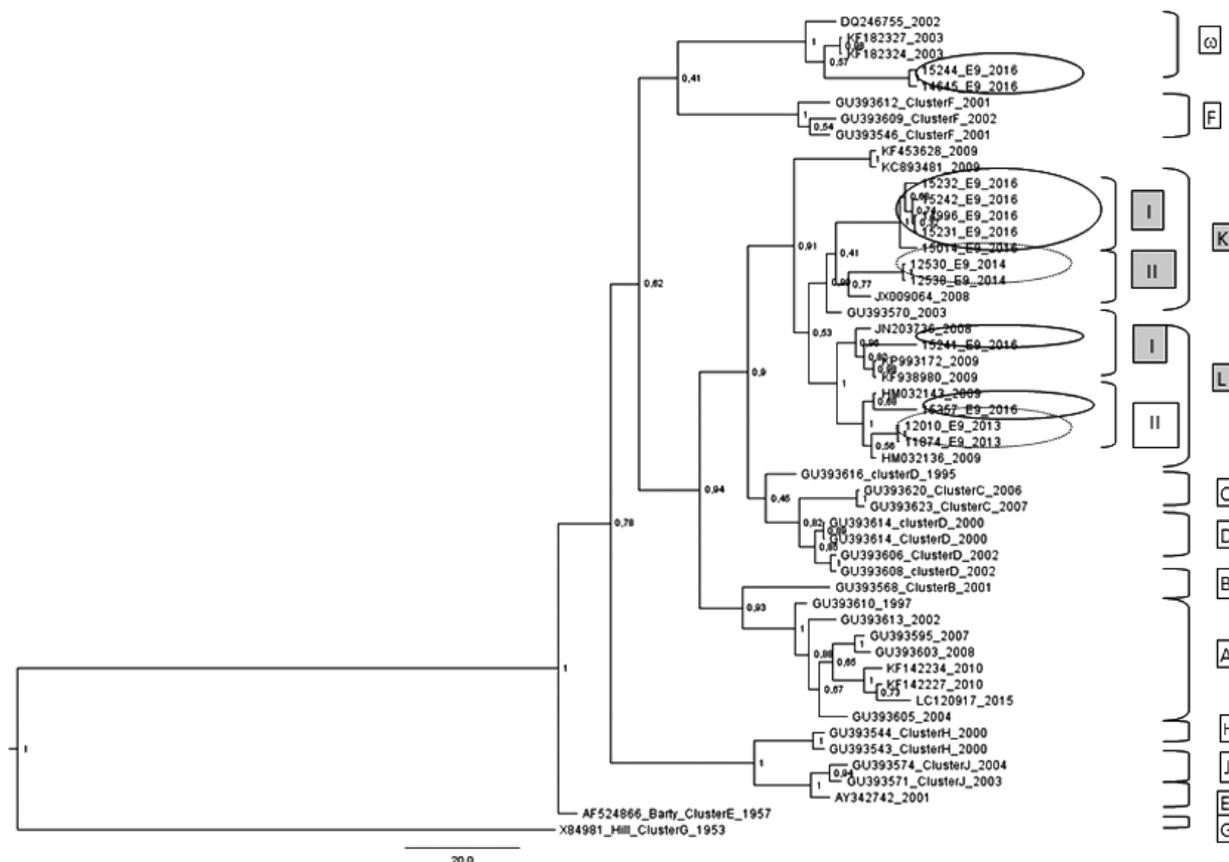
шего соседа (с использованием программы MEGA 6.0), а также алгоритма, основанного на теореме Байеса и методах Монте-Карло для цепей Маркова (с помощью пакета программ BEAST 1.7). Последний использован в связи с тем, что с помощью алгоритма присоединения ближайшего соседа не удалось получить филогенетическое древо с достаточной достоверностью топологии.

В настоящее время имеется несколько публикаций, посвященных молекулярной эпидемиологии вирусов ЕСНО 9, которые широко циркулируют в человеческой популяции [7–9, 11–13]. Авторы ряда работ уже выделяли отдельные генетические линии и геноварианты этого серотипа. Поэтому в филогенетическую реконструкцию помимо 14 исследуемых изолятов были включены также нуклеотидные последовательности выделенных в различное время в разных странах мира 46 референс-штаммов, которые генетически охарактеризованы ранее.

Результатом филогенетической реконструкции явилось древо, представленное на рисунке. Из рисунка видно, что все исследованные белорусские изоляты ЕСНО 9 достоверно формируют монофилетические кластеры как между собой, так и с вирусами, выделенными в других странах. На филогенетическом древе белорусские изоляты 2013–2016 гг. группировались в составе 6 отдельных кластеров, 4 из которых включали вирусы, обнаруженные у пациентов в 2016 г., и по одному кластеру – изоляты 2013 и 2014 гг. Все эти кластеры входили в состав трех довольно крупных геногрупп ЕСНО 9 – К, L, ω . Описанная ранее группа ω включала вирусы, циркулировавшие в 2002–2003 гг. в Бразилии и Аргентине [8, 9]. В эту же геногруппу в составе отдельного кластера входили белорусские изоляты 14645, 15244 (табл. 2, группа 1). Все остальные белорусские изоляты 2013, 2014 и 2016 г. входили в состав геногрупп К и L, которые не были описаны ранее, и формировали по два геноварианта внутри каждой из них. Геновариант К1 включал только белорусские изоляты, идентифицированные у пациентов с нейроинфекциями в 2016 г. (табл. 2, группа 2), геновариант К2 – белорусские изоляты, циркулировавшие в 2014 г., а также изолят, выделенный в Дании в 2008 г. Белорусские и датский вирусы были в значительной степени эволюционно удалены друг от друга, что вполне закономерно, учитывая значительное время, разделяющее периоды их циркуляции, но достоверно (апостериорная вероятность 0,77) группировались в составе одного геноварианта. Таким образом, вирусы ЕСНО 9, циркулировавшие в 2014 и 2016 гг., входили в состав одной геногруппы К, но принадлежали к разным геновариантам К1 и К2. Геногруппа L также включала два геноварианта – L1 и L2. В состав геноварианта L1 входили белорусский изолят № 15241, идентифицированный в 2016 г. (табл. 2, группа 3), а также изоляты, циркулировавшие в Индии и Шри-Ланке в 2009 г. [10, 11]. Несмотря на группирование в составе единого монофилетического кластера и наличие ближайшего общего предка на древе, эти изоляты также были существенно генетически удалены друг от друга, что согласуется со значительным географическим и временным расстоянием, разделявшим периоды и регионы их циркуляции. Геновариант L2 объединял вирусы, циркулировавшие в нашей стране в 2013 г. (№ 11874 и № 12010) и 2016 г. (№ 15347), а также в России в 2009 г. Данный геновариант описан ранее российскими исследователями как наиболее массовый в 2009 г. на разных территориях России [7]. Остальные геногруппы, ранее идентифицированные в составе вирусов ЕСНО 9 [12], на территории нашей страны не выявлены.

В представленной работе изложены результаты молекулярно-эпидемиологических исследований вирусов ЕСНО 9, вызвавших подъем заболеваемости энтеровирусными менингитами в двух регионах Республики Беларусь в 2016 г. Анализ данных лабораторной диагностики ЭВИ у пациентов с нейроинфекциями согласуется с эпидемиологическими данными о росте заболеваемости энтеровирусными менингитами: доля положительных на ЭВ образцов СМЖ, полученных в это же время и на территориях, где зарегистрирован их рост, значительно превышала таковую за 2016 г. в целом (50,9 и 26,2 % соответственно). Среди возбудителей энтеровирусных менингитов в 2016 г. заметно преобладали вирусы ЕСНО 9: они выявлены в 59,0 % проб, в которых удалось установить серотип возбудителя. Кроме них идентифицированы другие ЭВ, встречавшиеся значительно реже: ЕСНО 16 – 22,7 %, ЕСНО 6 – 9,0, ЕСНО 19 и Коксаки А9 – по 4,5 %.

Исходя из изложенного выше очевидно, что основную роль в формировании подъема заболеваемости энтеровирусными менингитами в 2016 г. в Республике Беларусь сыграли вирусы ЕСНО 9. Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными на сегодняшний день данными других исследователей о том, что вирус ЕСНО 9 является одним из доминирующих этиологических



Филогенетическая реконструкция на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *VP1 60* изолятов и штаммов вируса ЕСНО 9, выполненная с помощью пакета программ BEAST 1.7. Изоляты 2016 г. обозначены сплошными овалами, изоляты 2013–2014 гг. – пунктирными овалами, геногруппы (A–L, ω) и геноварианты (I, II) в составе геногрупп – квадратными скобками

On the basis of the analysis of nucleotide sequences of the gene *VP1* fragment, the phylogenetic reconstruction of 60 isolates and strains of the virus ECHO 9 was made using BEAST 1.7. Isolates of the year 2016 are denoted by the solid ovals, isolates of the years 2013–2014 – by the dashed ovals, genogroups (A–L, ω) and genovariants (I, II) in the genogroups – by the square brackets

агентов серозного менингита, а также других энтеровирусных нейроинфекций [1]. Классическая и молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 9 активно изучалась исследователями разных стран мира [1, 7–8, 11–15]. В более ранних работах установлено, что вирус ЕСНО 9, как правило, носит эпидемический характер циркуляции, вызывая крупные сезонные подъемы заболеваемости на определенной территории приблизительно каждые 3 года [1, 15]. Так же как и другие серотипы ЭВ, ЕСНО 9 имеет чрезвычайно высокий уровень генетической изменчивости [7, 12]. При этом эпидемический характер распространения данного возбудителя приводит к тому, что в периоды подъемов вызванной им заболеваемости среди населения циркулируют вирусы, принадлежащие к одной и той же генетической линии и даже к одному геноварианту [12]. Исследования, проведенные на большом количестве изолятов ЕСНО 9, зарегистрированных с конца 1990-х годов по 2008 г. на обширной географической территории, показали, что вирусы, циркулировавшие в одном и том же регионе в течение длительного времени, очень близки: на территории различных стран Западной Европы циркулировал геновариант А, а в странах постсоветского пространства – геновариант С [12]. Аналогичные исследования, проведенные в Латинской Америке, также показали циркуляцию одного геноварианта (ω) в Бразилии и Аргентине [8, 9]. При этом данный геновариант до проведения настоящих исследований не обнаруживался на территории Евразии. Российские исследователи, изучавшие молекулярную эпидемиологию вирусов ЕСНО 9, выявленных в разных регионах России в 2007–2009 гг., показали возможность одновременной циркуляции нескольких геновариантов ЕСНО 9 на одной и той же территории – в их исследованиях одновременно идентифицированные изоляты имели 10–15 % и более различий в нуклеотидной последовательности капсидного белка VP1 [7].

Таким образом, из накопленных литературных данных следует, что для вирусов ЕСНО 9 характерен как эндемичный (длительная циркуляция одних и тех же геновариантов в пределах определенных географических регионов), так и эпидемический (быстрое распространение одного геноварианта, сопровождающееся эпидемическим подъемом заболеваемости) характер циркуляции, а также возможна генетическая гетерогенность вирусов, циркулирующих на одной территории [7, 12].

Представленные в настоящей работе результаты, с одной стороны, отражают обозначенные выше особенности молекулярной эпидемиологии данного возбудителя, с другой – имеют существенные отличия от закономерностей, ранее описанных в литературе [7–9, 12]. Они указывают на значительную генетическую гетерогенность обнаруженных в 2016 г. в Беларуси вирусов ЕСНО 9 – идентифицировано четыре различных геноварианта, принадлежащих к трем разным геногруппам. Среди идентифицированных геновариантов один (L2) является эндемичным как для Беларуси, так и для Европейского региона России: изоляты, принадлежащие этому геноварианту, идентифицированы в Беларуси с 2013 по 2016 г., а также на территории России начиная с 2009 г. [7]. Остальные три геноварианта, к которым принадлежали белорусские изоляты, объединяли вирусы ЕСНО 9, циркулировавшие в различные периоды времени на очень удаленных друг от друга территориях. Так, генетическая линия ω помимо белорусских изолятов 2016 г. включала вирусы, циркулировавшие в Бразилии и Аргентине (2002–2003 гг.), геновариант L2 – вирусы из Беларуси (2016 г.), Индии и Шри-Ланки (2008–2009 гг.). Такое широкое распространение одних и тех же геновариантов или генетических линий вирусов ЕСНО 9 ранее описано не было. Эти данные указывают на то, что отдельные геноварианты вирусов ЕСНО 9 могут распространяться глобально в пределах земного шара и их циркуляция далеко не всегда является эндемичной для определенных географических регионов, как предполагалось ранее [12].

Еще одной особенностью, выявленной в наших исследованиях и не описанной в предыдущих работах, является генетическая гетерогенность циркулировавших в 2016 г. вирусов ЕСНО 9, несмотря на эпидемический характер их циркуляции. Так, в период эпидподъема на территории Минска и Гомельской обл. идентифицировано три геноварианта ЕСНО 9. Результаты же исследований, проведенных другими авторами, которые изучали молекулярную эпидемиологию ЕСНО 9 в периоды вспышек и эпидподъемов, указывали на то, что их этиологические агенты генетически весьма сходны и принадлежат к одному и тому же геноварианту [12]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что молекулярная эпидемиология ЭВ в целом и вирусов ЕСНО 9 в частности может быть гораздо более сложной и при ее дальнейшем, более глубоком изучении могут быть получены новые данные, более полно отражающие закономерности циркуляции вирусов в человеческой популяции.

Одним из возможных объяснений наблюдаемой генетической гетерогенности популяции вирусов ЕСНО 9 может быть их прямое секвенирование из клинического материала, без выделения на культурах чувствительных клеток млекопитающих (RD, Нер-2с). Следует отметить, что начиная с 1996 г. нам не удалось выделить ни одного изолята ЕСНО 9, несмотря на наличие богатой коллекции других энтеровирусных серотипов, изолированных из клинического материала пациентов в течение 20-летнего периода мониторинга за ЭВИ в Республике Беларусь. Можно предположить, что используемые для выделения культуры клеток млекопитающих имеют низкую чувствительность к вирусам ЕСНО 9, что подтверждается данными зарубежной литературы. Так, в 2006 г. исследователями из США проведен ретроспективный анализ эффективности выделения ЭВ в культурах клеток млекопитающих. В результате в культуре клеток РМК удалось выделить ЕСНО 9 из 93 % используемых проб клинического материала, а в культуре RD (рекомендуется ВОЗ для выделения неполиомиелитных ЭВ, была использована в настоящих исследованиях) – только из 1 % проб [16]. Из этого следует, что клеточная линия RD не является оптимальной для выделения вирусов ЕСНО 9. Хотя, вследствие значительного их генетического разнообразия, среди всех циркулирующих геновариантов, безусловно, могут встречаться и те, которые способны размножаться в клетках RD. Таким образом, при выделении полноценных изолятов вируса ЕСНО 9 в культурах чувствительных клеток происходит селекция только тех геновариантов, которые способны в них размножаться. Последующее их секвенирование приводит к тому, что значительная часть циркулировавших геновариантов остается не идентифицированной. В свою очередь те исследователи, которые анализируют непосредственно вирусную РНК из клинических проб (прямое секвенирование продуктов ОТ-ПЦР), обнаруживают значи-

тельно больше одновременно циркулировавших геновариантов. Подтверждением этого могут быть опубликованные данные российских исследователей [7], а также представленные в настоящей работе результаты об одновременной циркуляции нескольких геновариантов ЕСНО 9.

Заклучение. В результате проведенных исследований установлено, что основным этиологическим агентом подъема заболеваемости неврологическими формами ЭВИ в Минске и Гомельской области в 2016 г. были вирусы ЕСНО 9. Анализ нуклеотидных последовательностей идентифицированных изолятов ЕСНО 9 показал их значительную генетическую гетерогенность. Филогенетическая реконструкция позволила установить принадлежность исследуемых изолятов к трем различным геногруппам и четырем геновариантам. Две из трех геногрупп ЕСНО 9 (L и K) ранее описаны не были, а циркуляция геногруппы ω не обнаруживалась на территории Евразии до начала настоящих исследований. Один из идентифицированных геновариантов носил эндемичный характер циркуляции и выявлен на территории Беларуси в 2013 г., циркуляция остальных геновариантов до 2016 г. в нашей стране не зарегистрирована.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли молекулярно-эпидемиологических исследований в системе надзора за циркуляцией неполиомиелитных ЭВ с целью выявления новых возбудителей и их геновариантов и прогнозирования возможных сценариев развития эпидемиологической ситуации по энтеровирусным инфекциям.

Список использованных источников

1. Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005 / N. Khetsuriani [et al.] // *MMWR Surveill. Summ.* – 2006. – Vol. 55. – P. 1–20.
2. Актуальные проблемы энтеровирусных инфекций в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / Т. В. Амвросьева [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова.* – Минск, 2016. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM). – Вып. 9. – С. 9–15.
3. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 215, N 3. – P. 403–410.
4. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30, N 12. – P. 2725–2729.
5. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 / A. J. Drummond [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2012. – Vol. 29, N 8. – P. 1969–1973.
6. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1 / M. S. Oberste [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37, N 5. – P. 1288–1293.
7. Молекулярно-генетические варианты вируса ЕСНО9, идентифицированные у больных серозным менингитом в России в 2007–2009 гг. / Л. Н. Голицына [и др.] // *Вопр. вирусологии.* – 2011. – Т. 56, № 6. – С. 37–42.
8. Rubella virus genotype 1G and echovirus 9 as etiologic agents of exanthematous diseases in Brazil: insights from phylogenetic analysis / C. A. Figueiredo [et al.] // *Arch. Virol.* – 2014. – Vol. 159, N 6. – P. 1445–1451.
9. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children / A. S. Mistchenko [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2006. – Vol. 37, N 4. – P. 293–299.
10. Rao, C. D. Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007–2009 / C. D. Rao, P. Yergolkar, K. S. Shankarappa // *Emerg. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 18, N 11. – P. 1833–1840.
11. Acute meningoencephalitis associated with echovirus 9 infection in Sri Lanka, 2009 / N. Danthanarayana [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2015. – Vol. 87, N 12. – P. 2033–2039.
12. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30 / E. C. McWilliam Leitch [et al.] // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84, N 18. – P. 9292–9300.
13. Molecular evolution of human echovirus 9 isolated from patients with aseptic meningitis in northern Kyushu during the summer of 1997 / K. Hara [et al.] // *Microbiol Immunol.* – 2001. – Vol. 45, N 10. – P. 717–720.
14. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia / M. J. Ashwell [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 1996. – Vol. 117, N 3. – P. 507–512.
15. Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait / A. Dalwai [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2009. – Vol. 44, N 1. – P. 48–51.
16. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective / R. C. She [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2006. – Vol. 37, N 3. – P. 151–155.

References

1. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberst M. S., Pallansch M. A. Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *MMWR Surveillance Summary*, 2006, vol. 55, pp. 1–20.
2. Амвросьева Т. В., Богущ З. Ф., Бискина Н. М., Паклонская Н. В., Лозук С. К. Actual problems of enterovirus infections in Republic of Belarus. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka* [Modern problems of human infectious pathology], in Titov L. P. (ed.). Minsk, 2016, 1 electronic optical disc (CD-ROM), iss. 9, pp. 9–15.
3. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

4. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
5. Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, vol. 29, no. 8, pp. 1969–1973. doi: 10.1093/molbev/mss075.
6. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., Pallansch M. A. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, no. 5, pp. 1288–1293.
7. Golitsyna L. N., Fomina S. G., Novikova N. A., Epifanova N. V., Parfenova O. V., Lukovnikova L. B., Zverev V. V., Ponomareva N. V., Mazepa V. N., Grigor'eva G. I., Efimov E. I. Molecular genetic variants of the virus ESNO9, identified in patients with serous meningitis in Russia in 2007–2009. *Voprosy virusologii* [Virological issues], 2011, vol. 56, no. 6, pp. 37–42. (in Russian).
8. Figueiredo C. A., Luchs A., Russo D. H., R. Carmona Compagnolide Cassia, Afonso A. M., de Oliveira M. I., Curti S. P., de Moraes J. C., Toscano C. M., Ciccone F. H., Timenetsky Mdo C. Rubella virus genotype 1G and echovirus 9 as etiologic agents of exanthematous diseases in Brazil: insights from phylogenetic analysis. *Archives of Virology*, 2014, vol. 159, no. 6, pp. 1445–1451. doi: 10.1007/s00705–013–1935–9.
9. Mistchenko A. S., Viegas M., Latta M. P., Barrero P. R. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *Journal of Clinical Virology*, 2006, vol. 37, no. 4, pp. 293–299. doi: 10.1016/j.jcv.2006.08.009.
10. Rao C. D., Yergolkar P., Shankarappa K. S. Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, vol. 18, no. 11, pp. 1833–1840. doi: 10.3201/eid1811.111457.
11. Danthanarayana N., Williams D. T., Williams S. H., Thevanesam V., Speers D. J., Fernando M. S. Acute meningoencephalitis associated with echovirus 9 infection in Sri Lanka, 2009. *Journal of Medical Virology*, 2015, vol. 87, no. 12, pp. 2033–2039. doi: 10.1002/jmv.24267.
12. McWilliam Leitch E. C., Cabrerizo M., Cardosa J., Harvala H., Ivanova O. E., Kroes A. C., Lukashev A., Muir P., Odoom J., Roivainen M., Susi P., Trallero G., Evans D. J., Simmonds P. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. *Journal of Virology*, 2010, vol. 84, no. 18, pp. 9292–9300. doi: 10.1128/JVI.00783–10.
13. Hara K., Kashiwagi T., Ohtsu Y., Masunaga K., Akasu-Tsuji Y., Tsumura N., Kato H., Iwahashi J., Hamada N., Toyoda M., Toyoda T. Molecular evolution of human echovirus 9 isolated from patients with aseptic meningitis in northern Kyushu during the summer of 1997. *Microbiology and Immunology*, 2001, vol. 45, no. 10, pp. 717–720.
14. Ashwell M. J., Smith D. W., Phillips P. A., Rouse I. L. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiology and Infection*, 1996, vol. 117, no. 3, pp. 507–512.
15. Dalwai A., Ahmad S., Pacsa A., Nakib Al W. Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait. *Journal of Clinical Virology*, 2009, vol. 44, no. 1, pp. 48–51. doi: 10.1016/j.jcv.2008.10.007.
16. She R. C., Crist G., Billetdeaux E., Langer J., Petti C. A. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective. *Journal of Clinical Virology*, 2006, vol. 37, no. 3, pp. 151–155. doi: 10.1016/j.jcv.2006.06.009.

Информация об авторах

Поклонская Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Амвросьева Тамара Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: amvrosieva@gmail.com, labsanvir@gmail.com.

Лозюк Светлана Константиновна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Шилова Юлия Александровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Богущ Зоя Федоровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Бискина Нинель Михайловна – врач-эпидемиолог. Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ул. К. Цеткин, 4, 220099, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biskina@rche-ph.by.

Information about the authors

Natalia V. Paklonskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Tamara V. Amvrosieva – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: amvrosieva@gmail.com.

Svetlana K. Lozyuk – Junior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Yuliya A. Shilova – Junior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Zoya F. Bohush – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com.

Ninel M. Biskina – Epidemiologist. Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (4, K. Tsetkin Str., 220099, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biskina@rche-ph.by.