

УДК 61:578.7(047.3)(476), 578.5-047.36(047.3)(476)

*Н. В. ПОКЛОНСКАЯ¹, Т. В. АМВРОСЬЕВА¹, З. Ф. БОГУШ¹, К. Л. ДЕДЮЛЯ¹, О. Н. КАЗИНЕЦ¹,
И. Н. ГЛИНСКАЯ², А. М. ДАШКЕВИЧ², Н. Л. КЛЮЙКО³*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ,
ДОМИНИРУЮЩИХ В БЕЛАРУСИ В 2012–2013 ГГ.**

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

²Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Беларусь,

³Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 21.07.2014)

Введение. Эпидемический процесс в Республике Беларусь в течение последнего десятилетия характеризовался циклической сменой эпидемически благополучных периодов и подъемов заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ). Период с 2010 по 2011 г. по уровню ЭВИ был относительно благополучным, но с 2012 г. интенсивность эпидемического процесса значительно возросла, и 2013 г. стал вторым годом циклического подъема. В 2013 г. суммарно подъем заболеваемости ЭВИ отмечался в Витебской, Гомельской, Могилевской областях и г. Минске. Рост ЭВИ в 2013 г. в Витебской области произошел преимущественно за счет сезонного подъема заболеваемости менингитами (от 0,75 до 15,49 на 100 тыс. населения), в г. Минске – фарингитами (от 18,52 до 29,25 на 100 тыс. населения), в Могилевской области – гастроэнтеритами (с 1,83 до 8,55 на 100 тыс. детей) [1].

Цель исследования – установление особенностей молекулярной эпидемиологии циркулировавших на территории Беларуси неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) для выявления закономерностей, определивших зарегистрированные различия в структуре клинических форм и уровней заболеваемости по территориям.

Материалы и методы исследования. В работе использовано 25 изолятов НПЭВ, выделенных из проб клинического материала и объектов окружающей среды в различных регионах страны и 16 образцов клинического материала, из которых была выделена РНК НПЭВ и проведено прямое секвенирование без выделения вирусов в культуре клеток. Все исследуемые образцы были получены в 2012–2014 гг. на территории г. Минска, Минской, Гомельской, Витебской и Могилевской областей.

Выделение РНК НПЭВ из исследуемых проб, обратную транскрипцию и ОТ-ПЦР осуществляли с помощью наборов «АмплиСенс»: «РИБО-преп», «Реверта» и «АмплиСенс® Enterovirus-FL» (Россия).

Для секвенирования участков генома НПЭВ использовали два региона генома, кодирующих основной капсидный белок и фрагмент гена РНК-зависимой РНК-полимеразы [2, 3]. Секвенирование ДНК проводили методом терминации цепи с последующим анализом на ДНК-анализаторе CEQ8000.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [4]. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли с помощью программы MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 6.0 [5].

Результаты и их обсуждение. Циркуляция отдельных серотипов НПЭВ в 2012–2013 гг. в различных регионах имела выраженные отличия (рис. 1). Результаты анализа НПЭВ, выделенных в 2012–2013 гг. на территории Беларуси, позволили установить три доминирующих серотипа: ЕСНО 11 (40,4 %), ЕСНО 30 (31,5 %) и ЕСНО 6 (10,1 %). Вирус ЕСНО 11 циркулировал преимущественно на территории Витебской области (89 %), значительно реже – в Минской области, г. Минске и Могилевской области (2,6–5,2 %). Большинство изолятов ЕСНО 11 было выделено от пациентов с серозным менингитом (71,4 %). Полученные данные дают основания полагать, что зарегистрированный в Витебской области летом–осенью 2013 г. 20-кратный рост заболеваемости энтеровирусным серозным менингитом в значительной степени был связан именно с циркуляцией вируса ЕСНО 11. Циркуляция вируса ЕСНО 30 в 2013 г. носила значительно более равномерный характер. Она была зарегистрирована на территории Витебской, Гомельской, Минской областей и в г. Минске. Наиболее часто серотип ЕСНО 30 выявлялся в г. Минске (12,2 %) и в Витебской области (12,3 %). В Гомельской и Могилевской областях доля идентифицированных изолятов ЕСНО 30 составила 4,5 и 2,2 % соответственно. До 2012 г. активная циркуляция данного серотипа была зарегистрирована в 2003 г. во время вспышки ЭВИ в г. Минске, Минской и Брестской областях. В период между 2003 и 2012 г. регистрировались единичные случаи выделения данного серотипа в 2004, 2007 и 2009 гг., преимущественно из объектов окружающей среды. На территории Гомельской области циркуляция ЕСНО 30 наблюдалась осенью 2012 г. на фоне подъема заболеваемости серозным менингитом.

Вирус ЕСНО 6 циркулировал с невысокой интенсивностью среди населения г. Минска, Витебской и Могилевской областей, не являясь ни в одном из этих регионов доминирующим серотипом. Третье место в рейтинге циркуляции НПЭВ у ЕСНО 6 можно объяснить скорее широким географическим распространением, а не интенсивной циркуляцией.

Одной из эпидемиологических особенностей сезонного подъема заболеваемости ЭВИ в 2013 г. был практически двукратный рост заболеваемости энтеровирусными фарингитами в г. Минске (от 18,52 до 29,25 на 100 тыс. населения) [1]. Циркуляция НПЭВ в столице (рис. 1) имела некоторые отличия от их циркуляции в других регионах страны. Так, помимо ЕСНО 30 доминирующими серотипами были также вирусы Коксаки В3 (CVB3) и Коксаки А9 (CVA9), которые практически не выявлялись на других территориях.

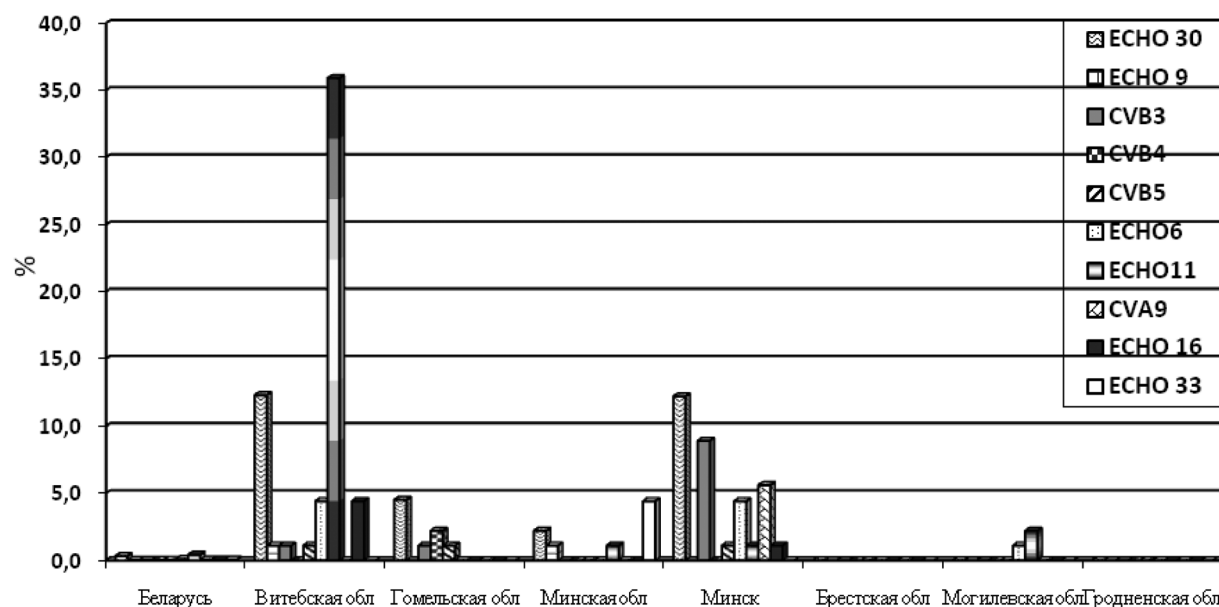


Рис. 1. Циркуляция отдельных серотипов неполиомиелитных энтеровирусов на территории различных регионов Беларуси. По оси абсцисс – доля идентифицированных изолятов различных серотипов, по оси ординат – географическая локализация идентифицированных изолятов

В ходе исследования в течение 2012–2013 гг. с помощью молекулярного типирования был идентифицирован 41 изолят НПЭВ. Молекулярно-эпидемиологический анализ проводили в отношении наиболее широко распространенных (ЕСНО 11, ЕСНО 30, ЕСНО 6) или новых для нашей страны (CVB3, CVA9) серотипов. Для анализа использовали два региона генома – ген основного капсидного белка (*VP1*) и ген, кодирующий РНК-полимеразу НПЭВ (*3CD*). Выбор второго региона генома для анализа был обусловлен тем, что все НПЭВ по этому участку являются рекомбинантами в пределах каждого из четырех видов – *Human Enterovirus A, B, C* и *D* [6]. Этот факт позволяет разделить изоляты, имеющие общую эволюционную историю (малое генетическое расстояние по двум исследованным регионам), от тех, которые разошлись в результате рекомбинации и не могут быть отнесены к одной эволюционной линии.

Результаты филогенетической реконструкции по фрагменту гена *VP1* (200 нуклеотидов) вирусов ЕСНО 30, ЕСНО 11, ЕСНО 6 и Коксаки В3 представлены на рис. 2. Для сравнения в анализ были включены нуклеотидные последовательности изолятов тех же серотипов, циркулировавших в Беларуси в предшествующие годы начиная с 1997 г., а также НПЭВ, циркулировавших в других странах. Молекулярно-эпидемиологический анализ вирусов ЕСНО 30 показал (рис. 2), что все изоляты 2012–2013 гг. объединялись в один монофилетический кластер, в который входили также несколько вирусов, выделенных в других странах мира. Среднее эволюционное расстояние внутри данного кластера составило $0,028 \pm 0,007$ нуклеотидных замен/сайт, тогда как эволюционное расстояние между изолятами ЕСНО 30, циркулировавшими на территории нашей страны в 2012–2013 гг. и в предшествующие годы (с 1997 по 2009 г.), было в 5,7–7,4 раза выше (0,162–0,208 нуклеотидных замен/сайт соответственно). Этот факт указывает на то, что связываемая с вирусом ЕСНО 30 заболеваемость ЭВИ в 2012–2013 гг. не была обусловлена ранее циркулировавшими в стране геновариантами вируса ЕСНО 30. С целью более полной идентификации циркулировавшего геноварианта с учетом вероятной рекомбинации было выбрано два изолята ЕСНО 30 (№ 12014 и 12145), для которых проведен развернутый генетический анализ, включающий полную последовательность гена капсидного белка *VP1* (876 нуклеотидов) и фрагмент последовательности неструктурных белков *3CD* (3С пептидаза и 3D РНК-полимераза, 1076 нуклеотидов). Осуществленный по двум регионам анализ позволил идентифицировать близкородственные штаммы ЕСНО 30 с учетом как мутационной, так и рекомбинационной изменчивости. Результаты генетического анализа изолятов ЕСНО 30 (№ 12014 и 12145) показали, что они обладали максимальной степенью сходства по обоим исследованным регионам со штаммом E30SD2010CHN. По гену капсидного белка *VP1* исследуемые изоляты обнаруживали 95,8–96,5 % сходства нуклеотидной последовательности, а по участку 3С-3D – 96,6–96,9 % сходства. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые изоляты ЕСНО 30 (№ 12145 и 12014) принадлежали к тому же геноварианту вируса ЕСНО 30, что и штамм E30SD2010CHN. Данный генетический вариант вируса ЕСНО 30 был выделен от пациентов с наиболее тяжелыми случаями инфекции в Китае в 2010–2011 гг. во время двух вспышек вирусной пузырчатки (hand-foot-and mouth disease) [7]. С учетом этих результатов очевидно, что активная циркуляция в 2012–2013 гг. вируса ЕСНО 30 была обусловлена заносом извне нового высоковирулентного его геноварианта, впервые идентифицированного в 2010 г. в Китае.

По результатам филогенетической реконструкции (рис. 2) все изоляты ЕСНО 11 2013 г. относились, согласно классификации С. Оберста [8], к генетической линии D5, тогда как ранее циркулировавшие в нашей стране вирусы ЕСНО 11 (2006 г.) принадлежали к генетической линии D4. Однако в составе общего кластера D5 изоляты 2013 г. формировали два отдельных субкластера, в которые входили изоляты № 12012, 12163, 12144 (субкластер D5-1), 12084, 12107 (субкластер D5-2). Изолят № 12051 группировался отдельно и не вошел ни в один из субкластеров. Последующее исследование полного гена *VP1* и фрагмента 3С-3D 5 изолятов ЕСНО 11 (№ 12012, 12163, 12084, 12107, 12051) показало, что по гену *VP1* наибольшим сходством с исследуемыми обладали изоляты ЕСНО 11 (95,2–98,3 %), циркулировавшие во Франции в 2010–2012 гг. Однако по региону 3CD не было найдено вирусов, обладавших такой же долей сходства с исследуемыми. Наиболее сходным по данному фрагменту был Энтеровирус 86, идентифицированный в Бангкоке в 2000 г. и имевший не более 84 % сходства с белорусскими изолятами ЕСНО 11. Таким образом, в между-

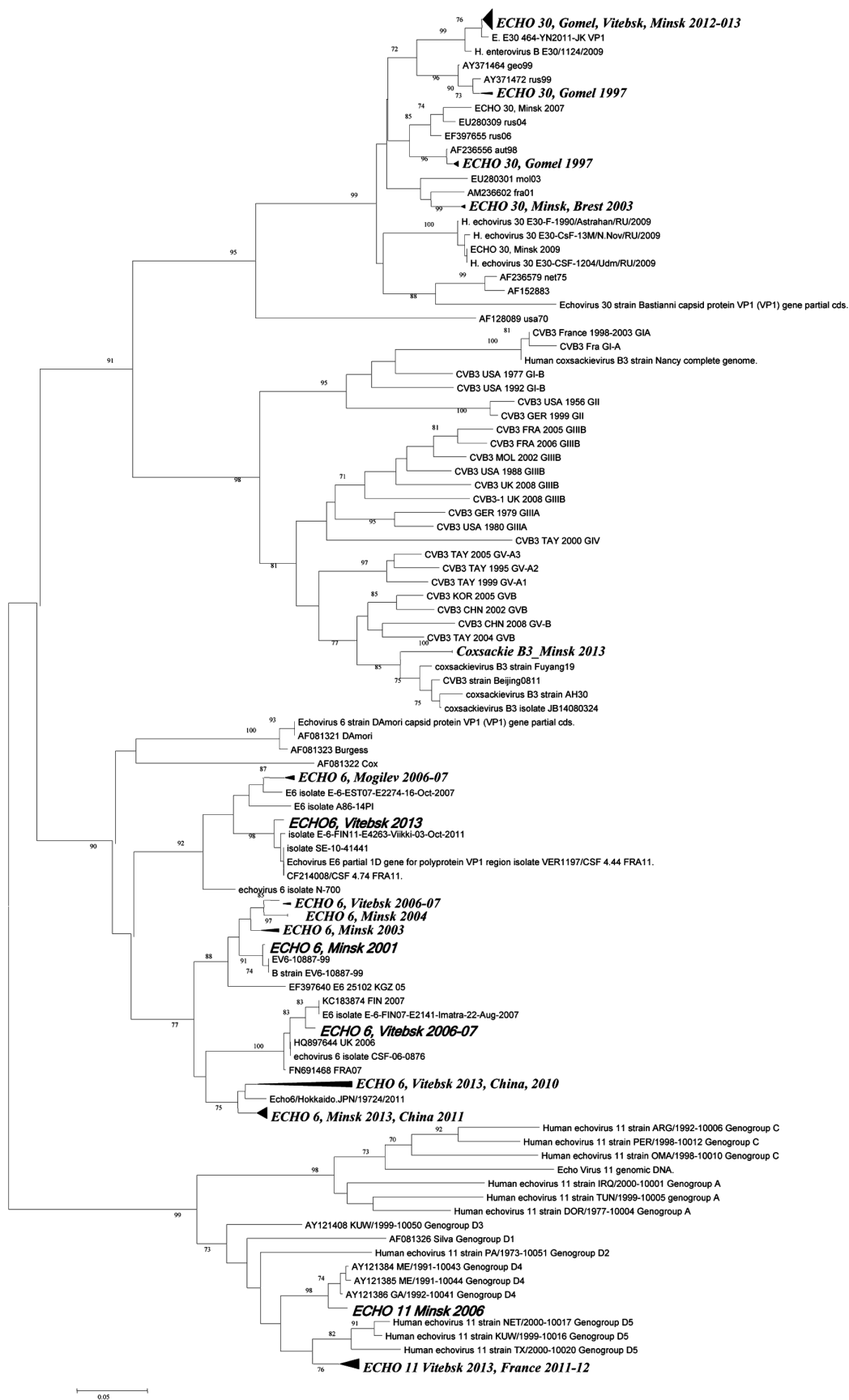


Рис. 3. Результаты филогенетической реконструкции на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *VP1* изолятов CVA9

народной базе данных не обнаружено нуклеотидных последовательностей вирусов ЕСНО 11, которые по двум исследованным регионам могли относиться к той же генетической линии, что и ЕСНО 11, циркулировавшие в Беларуси в 2013 г. Основываясь на этих данных, на сегодняшний день нельзя однозначно утверждать о заносе данного геноварианта вируса ЕСНО 11 из-за рубежа, так же как и о его появлении на территории нашей страны в результате рекомбинации.

Вирус ЕСНО 6, третий по интенсивности циркуляции серотип НПЭВ в 2013 г., широко циркулировал в нашей стране в последнее десятилетие [9]. Результаты филогенетического анализа (рис. 2) показали, что в отличие от вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 11 популяция циркулировавших в 2013 г. вирусов ЕСНО 6 характеризовалась значительной генетической гетерогенностью и включала три различные, достаточно удаленные друг от друга генетические линии вируса. Одна из этих линий включала единственный изолят № 12006 (I), выделенный в Витебской области, вторая – группу изолятов (№ 11990, 11938, 11987, 11980, 11975 (II)), выделенных в г. Минске, третья – вирусы ЕСНО 6 (№ 12149, 12150, 12164 (III)), циркулировавшие в Витебской области. Все эти генетические линии помимо белорусских изолятов включали вирусы ЕСНО 6, циркулировавшие в других странах и обладавшие 98–99 % сходства с исследуемыми (вирусы, циркулировавшие в 2011 г. во Франции, Финляндии, Китае и Японии). Для детального генетического анализа было выбрано по одному изоляту из каждой генетической линии (№ 12006 (I), 11975 (II), 12150 (III)) и проведено исследование их нуклеотидной последовательности полного *VP1*-гена (876 нуклеотидов) и 3CD региона (737 нуклеотидов). Полученные результаты показали, что изоляты трех групп имели сходную долю различий по двум исследованным регионам. Изолят № 12006 (I) имел 18,8–19,0 % нуклеотидных различий по *VP1* и 15,5–16,0 % по 3CD региону с изолятами II и III групп, тогда как последние были значительно менее удалены друг от друга – 4,5 % по *VP1*, 3,5 % по 3CD регионам. Сравнительный генетический анализ показал, что II и III группы изолятов ЕСНО 6 обладали значительной степенью сходства со штаммом ЕСНО 6 E6SD11CHN, идентифицированным в 2011 г. в Китае: по региону *VP1* они обнаруживали 96,0–97,9 % сходства, а по региону 3C3D – 95 % сходства. Что касается изолята ЕСНО 6 I группы (№ 12006), наибольшей степенью сходства с ним (90,5 %) по региону 3C3D обладал вирус ЕСНО 25, выделенный во Франции в 2002 г. Таким образом, вирусов ЕСНО 6, имеющих общую эволюционную историю с белорусским изолятом ЕСНО 6 I геногруппы (№ 12006) и циркулировавших в других странах мира, не обнаружено. Полученные результаты генетического анализа ЕСНО 6 свидетельствуют о том, что в 2013 г. в Беларуси имела место параллельная циркуляция трех различных генетических вариантов вируса ЕСНО 6 (изоляты I–III геногрупп). Причем для двух генетических вариантов обнаружен штамм E6SD11CHN, циркулировавший в 2011 г. в Китае и имевший общую эволюционную историю с белорусскими изолятами II и III генетических групп ЕСНО 6. Данный штамм, так же как и штамм ЕСНО 30, был идентифицирован во время крупной вспышки, характеризовавшейся чрезвычайной массовостью и тяжестью течения, вирусной пузырчатки в Китае в 2011 г. (более 3 млн заболевших, 1414 умерших) [7].

Результаты филогенетического анализа белорусских изолятов CVB3 № 11906, 12003 (рис. 2) позволили установить их принадлежность к генотипу V-B [10], циркулировавшему в предшествующие годы на территории стран Юго-Восточной Азии. Они достоверно группировались в составе общего кластера с вирусами, циркулировавшими в различных провинциях Китая в 2008 г. (среднее эволюционное расстояние $0,037 \pm 0,009$ нуклеотидных замен/сайт). Полученные результаты, свидетельствующие о принадлежности капсидного региона генома CVB3 к генотипу, циркуляция которого имеет четкую географическую локализацию (Юго-Восточная Азия), позволили предположить занос вируса CVB3 с территории Китая или сопредельных стран. Для подтверждения этого был проведен генетический анализ полной последовательности гена *VP1*, фрагмента 2A (938 нуклеотидов) и фрагмента генома 3CD (1073 нуклеотидов) белорусских изолятов CVB3 (№ 11906, 12003). Полученные результаты показали, что оба белорусских изолята характеризовались высокой степенью сходства нуклеотидной последовательности по обоим исследованным регионам генома (*VP1*-2A и 3CD) с вирусами CVB3, циркулировавшими в Китае, что однозначно указывало на их принадлежность к единой эволюционной линии. По региону *VP1*-2A они имели 95,0–95,4 % сходства, по региону 3CD – 95,7–95,8 % сходства. Следует отме-

тять, что штаммы, выделенные в Китае и принадлежавшие к той же генетической линии, что и белорусские изоляты CVB3, циркулировали в 2008–2011 гг. и были выделены от пациентов с миокардитом, энцефалитом и тяжелой формой вирусной пузырчатки [11].

Полученные нами данные о принадлежности к единой генетической линии и о значительной степени сходства белорусских и китайских вирусов ECHO 30, ECHO 6 и CVB3 не позволяют, однако, сделать вывод о непосредственном их заносе из Китая, так как в этом случае доля генетических различий между изолятами, вероятнее всего, не превышала бы 1–1,5 %. Накопление в их геномах 3–5 % различий свидетельствует о том, что данные генетические варианты циркулировали в человеческой популяции какое-то время (2–5 лет), т. е. в период между их первичной идентификацией в Китае в 2008–2011 гг. и временем их появления на территории Беларуси в 2012–2013 гг.

Вирус Коксаки А 9 (CVA9) был идентифицирован молекулярными методами у пациентов в г. Минске осенью 2013 г. Филогенетический анализ изолятов CVA9, идентифицированных у пациентов в 2013 г., проводили по фрагменту нуклеотидной последовательности гена *VPI* длиной 250 нуклеотидов. Результаты анализа белорусских изолятов CVA9, представленные на рис. 3, свидетельствовали об их принадлежности к генетической линии 2, ранее обнаруживаемой преимущественно на территории Китая [12]. Внутри данной линии среди белорусских изолятов CVA9 наблюдалось определенное генетическое разнообразие – они принадлежали к двум

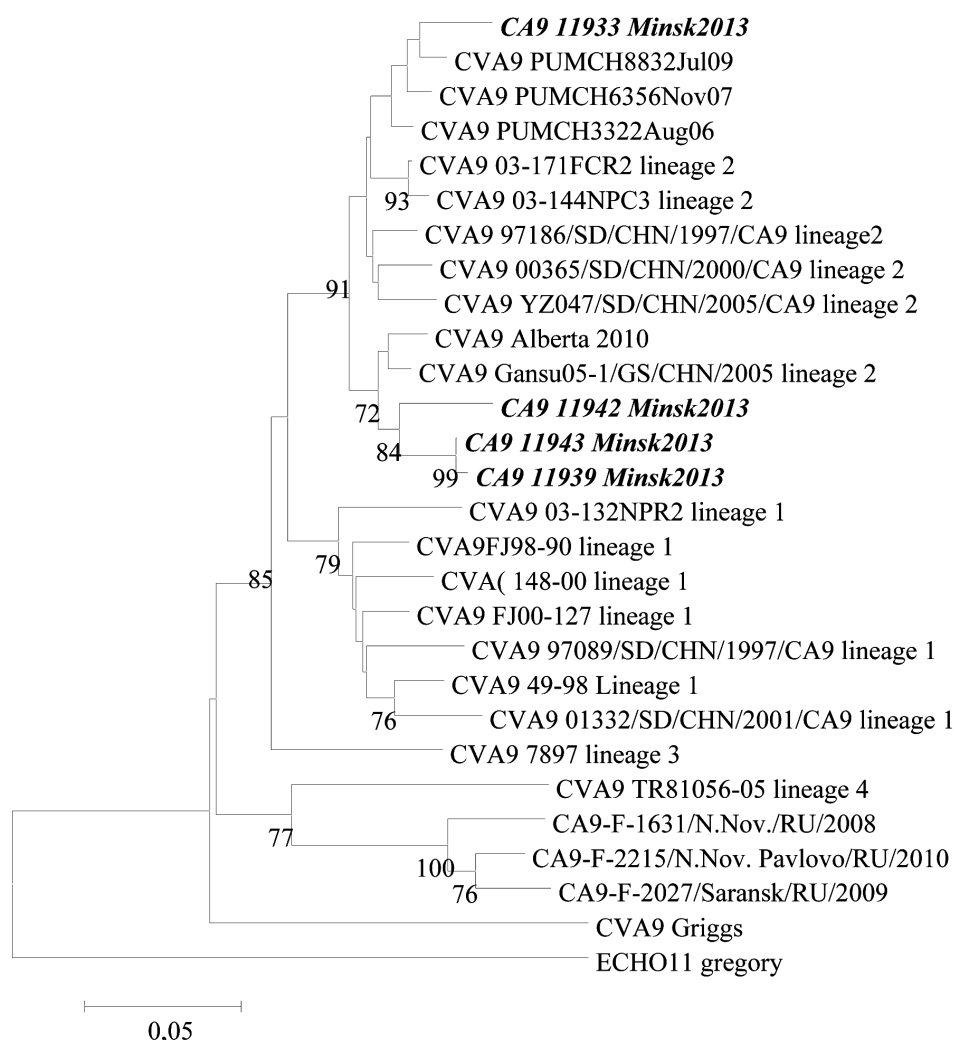


Рис. 2. Результаты филогенетической реконструкции на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *VPI* изолятов ECHO 11, ECHO 30, ECHO 6, CVB3, идентифицированных в Беларуси в 1997–2013 гг.

различным генетическим вариантам. Так, белорусский изолят CVA9 № 11933 группировался вместе с изолятами, которые циркулировали в Китае с 2006 по 2009 г. и были выделены преимущественно от детей с симптомами острой респираторной инфекции [13]. Белорусские изоляты CVA9 (№ 11939, 11942, 11943) принадлежали к другой генетической группе в составе второй генетической линии вируса – вместе с генетическим вариантом вируса CVA9 они вызвали вспышку в Китае в 2005 г. [12] и в Канаде в 2010 г. [14]. К этой же генетической группе принадлежали вирусы, идентифицированные на территории России (Чита, 2010).

Заключение. Подъем заболеваемости ЭВИ, зарегистрированный в Республике Беларусь в 2012–2013 гг., был обусловлен появлением новых геновариантов серотипов ЕСНО 30, ЕСНО 11, ЕСНО 6, CVB3 и CVA9.

Большинство выявленных геновариантов (ЕСНО 30, ЕСНО 6 и CVB3) возникло на территории Китая в периоды крупных вспышек и эпидемий и характеризовалось высоковирулентными свойствами.

Представленные результаты не позволяют достоверно утверждать о непосредственном заносе данных геновариантов с территории КНР, но с большой вероятностью свидетельствуют о постепенном распространении этих геновариантов в течение 2–5 лет с территории сопредельных стран.

В 2013 г. имела место генетическая гетерогенность популяций вирусов ЕСНО 11, ЕСНО 6 и CVA9, причем появление различных геновариантов ЕСНО 11, вероятнее всего, явилось следствием активной циркуляции данного серотипа на территории нашей страны, тогда как отдельные геноварианты ЕСНО 6 и CVA9 сформировались до 2013 г. на территории других стран мира.

Полученные данные о быстром распространении новых высоковирулентных геновариантов НПЭВ по территории различных стран в пределах единого эпидемического пространства диктуют необходимость осуществления как регулярного их молекулярно-эпидемиологического мониторинга в Республике Беларусь, так и тщательного анализа соответствующей информации о крупных вспышках ЭВИ за ее пределами.

Литература

1. Зуева В. Л. и др. Эпидемиологическая ситуация по энтеровирусным инфекциям в Республике Беларусь за 2013 год и направления деятельности по снижению заболеваемости на 2014 год: информ.-аналит. бюл. / под ред. Л. К. Наройчик. Минск, 2014. – 14 с.

2. Mirand A., Archimbaud C., Henquell C. et al. // J. Med. Virol. 2006. Vol. 78. P. 1624–1634.

3. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C. et al. // J. Gen. Virol. 2007. Vol. 88. P. 166–176.

4. Altschul S., Gish W., Miller W. et al. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215 (3). P. 403–410.

5. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30 (12). P. 2725–2729.

6. Santti J., Hyypia T., Kinnunen L. et al. // J. Virol. 1999. Vol. 73. P. 8741–8749.

7. Zhang T., Du J., Xue Y. et al. // PLoS ONE. 2013. Vol. 8 (6). P. e67157.

8. Oberste S., Nix W., Kilpatrick D. et al. // Virus Res. 2003. Vol. 91. P. 241–248.

9. Поклонская Н. В., Безручко А. А., Амвросьева Т. В. и др. // Молекулярная медицина. 2011. № 3. С. 48–53.

10. Chu P. Y., Ke G. M., Chen Y. S. et al. // Infect. Genet. Evol. 2010. Vol. 10 (6). P. 777–784.

11. Du J., Wu Z., Xue Y. et al. // Genome Announc. 2013. Vol. 1 (1). P. e00163.

12. Cui A., Yu D., Zhu Z. et al. // Virol. J. 2010. Vol. 7. P. 72.

13. Xiang Z., Gonzalez R., Wang Z. et al. // Emerg. Inf. Dis. 2012. Vol. 18 (5). P. 821–824.

14. Pabbaraju K., Wong S., Chan E. et al. // Virol. J. 2013. Vol. 10. P. 93.

N. V. PAKLONSKAYA, T. V. AMVROSIEVA, Z. F. BOGUSH, K. L. DZIADZULIA, O. N. KAZINETZ, I. N. GLINSKAYA,
A. M. DASHKEVICH, N. L. KLUIKO

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF PREDOMINANT NON-POLIO ENTEROVIRUSES IN BELARUS IN 2012–2013

Summary

New genovariants non-polio enterovirus (NPEV) serotypes ECHO 11, ECHO 30, ECHO 6, Coxsackievirus B3 and A9 caused a morbidity rise in Belarus in 2012–2013. Based on the results of the phylogenetic analysis, most of the revealed NPEV genovariants (ECHO 30, ECHO 6 and Coxsackievirus B3) arose in China during large outbreaks and had highly virulent properties. The obtained results demonstrate the significance of the molecular epidemiological study in the surveillance of enteroviral infection in Belarus.