

## Применение молекулярно-генетических методов при расследовании вспышек энтеровирусной инфекции в субъектах Дальневосточного федерального округа

Л.В. Бутакова<sup>1</sup> (adm@hniiem.ru), О.Е. Троценко<sup>1</sup>, Е.Ю. Сапега<sup>1</sup>,  
В.О. Котова<sup>1</sup>, Л.А. Балахонцева<sup>1</sup>, Т.А. Зайцева<sup>2</sup>, О.П. Курганова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора,  
г. Хабаровск

<sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, г. Хабаровск

<sup>3</sup>Управление Роспотребнадзора по Амурской области, г. Благовещенск

### Резюме

В статье приведены результаты молекулярно-генетических исследований клинического материала от больных из трех очагов вспышечной заболеваемости, зарегистрированных на территории Хабаровского края и Амурской области в 2012 – 2013 годах. Были получены штаммы энтеровирусов Коксаки А-4 и Коксаки А-16 из биопроб из очага заболеваемости в п. Де-Кастри Хабаровского края, штаммы ECHO-6 – из п. Усть-Уркима Амурской области и штаммы Коксаки А-6 – из г. Райчихинска Амурской области. Показано, что применение молекулярно-генетических методов при эпидемиологических расследованиях вспышек и групповых заболеваний энтеровирусной инфекцией позволяет идентифицировать энтеровирусы, выделенные от больных, а также выявить завозные случаи инфекции.

**Ключевые слова:** энтеровирус, вспышка энтеровирусной инфекции, штамм, молекулярно-генетические методы, секвенирование

### Use of Molecular Genetic Methods for Investigation of Outbreaks of Enterovirus Infection in the Subjects of the Far Eastern Federal District

L.V. Butakova<sup>1</sup> (adm@hniiem.ru), O.E. Trotsenko<sup>1</sup>, E.Yu. Sapega<sup>1</sup>, V.O. Kotova<sup>1</sup>, L.A. Balakhontseva<sup>1</sup>, T.A. Zaitseva<sup>2</sup>, O.P. Kurganova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well Being, Khabarovsk

<sup>2</sup>Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well Being of Khabarovsk Region, Khabarovsk

<sup>3</sup>Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well Being of Amur Region, Blagoveschensk

### Abstract

The results of molecular genetic studies of clinical samples taken from three foci of outbreaks of enterovirus infection, registered on the territory of Khabarovsk Krai and Amur Oblast from 2012 through 2013 were reported. Several strains of enteroviruses were obtained: strains of Coxsackie A-4 and Coxsackie A-16 from De-Kastri rural locality, strains of ECHO-6 from Ust'-Urikma (Amur Oblast) and strains of Coxsackie A-6 from Raichihisnsk (Amur Oblast). Use of molecular genetic methods for investigation of collective morbidity and outbreaks of enterovirus infection help to confirm the identity of enteroviruses, isolated from patients and to identify the imported cases of infection.

**Key words:** enterovirus, outbreak of enterovirus infection, strain, molecular genetic methods, sequencing

### Введение

Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) распространены повсеместно и ежегодно вызывают миллионы случаев заболеваний во всем мире [1 – 3]. Для ЭВИ характерен значительный полиморфизм клинических проявлений с отсутствием четкой зависимости от типа возбудителя, большая частота бессимптомных форм, длительное вирусоносительство, отсутствие специфических средств профилактики [2, 4].

Возможность заноса новых типов энтеровирусов на территорию Дальневосточного федерального округа (ДФО) с приграничных территорий Китайской Народной Республики является риском осложнения эпидемиологической ситуации в ДФО

и требует более широкого использования молекулярно-генетических методов при расследовании случаев ЭВИ [5].

Анализ нуклеотидных последовательностей участка VP1 генома энтеровирусов позволяет идентифицировать возбудителя инфекции и проводить мониторинг географического распространения вариантов энтеровирусов, а филогенетический анализ – определять степень генетического родства и возможные эпидемиологические связи между штаммами энтеровирусов при эпидемических вспышках или при сезонных подъемах заболеваемости энтеровирусной инфекцией [1 – 5].

**Цель исследования** – показать необходимость применения молекулярно-генетических методов

при расследовании очагов вспышечной заболеваемости энтеровирусной инфекцией для обнаружения филогенетических связей между выявленными штаммами энтеровирусов и определения их географического происхождения.

### Материалы и методы

Нами было исследовано 95 проб биологического материала из очагов вспышечной заболеваемости энтеровирусной инфекцией, зарегистрированных в весенне–летний период 2012 – 2013 годов на территории Хабаровского края и Амурской области. Из них 38 проб поступили в вирусологическую лабораторию ФБУН «ХНИИЭМ» из поселка Де-Кастри Ульчского района Хабаровского края, 42 пробы – из поселка Усть-Уркима Тындинского района Амурской области и 15 проб – из г. Райчихинска Амурской области. Биологический материал был представлен носоглоточными смывами, пробами фекалий и образцами спинномозговой жидкости.

Клиническая картина энтеровирусной инфекции в обследованных очагах была представлена следующими формами: в п. Де-Кастри (Хабаровский край) у всех заболевших наблюдалась энтеровирусная экзантема, в п. Усть-Уркима (Амурская область) были диагностированы серозно-вирусный менингит и респираторная форма ЭВИ, а в г. Райчихинск (Амурская область) – герпангина.

Во всех трех вспышечных очагах пострадали дети из организованных коллективов (38 человек).

Образцы биологического материала были исследованы в четыре этапа.

На первом этапе определяли наличие РНК непوليوмиелитных энтеровирусов в материале с помощью Real-Time ПЦР с использованием тест-систем производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

На втором этапе проводили амплификацию участка VP1 генома энтеровирусов со специфичными парами праймеров по M.S. Oberste с соавт. [7] с последующей электрофоретической детекцией полученного продукта в 2% агарозном геле.

На третьем этапе осуществляли секвенирование на автоматическом ДНК-анализаторе «Applied Biosystems 3500» (Life Technologies, Великобритания).

Четвертым этапом являлся филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей энтеровирусов с помощью программы MEGA 6.0. Поиск прототипных штаммов осуществлялся с помощью онлайн-программы BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Для расчета генетических расстояний между нуклеотидными последовательностями были использованы эволюционные модели Kimura, Tajima-Nei, Tamura-Nei [6, 8]. Построение филогенетических деревьев проводилось с помощью методов «Neighbour-joining» («присоединение соседей»), «Maximumlikelihood» («максимальное правдоподобие») и «Bootstrapanalysis»

(статистическая оценка дерева, метод повторных выборок) [6].

### Результаты и обсуждение

Из 38 проб биологического материала, направленных из п. Де-Кастри Хабаровского края, в 24 пробах были обнаружены РНК энтеровирусов. При дальнейшем генотипировании получено 5 нуклеотидных последовательностей – 2 штамма Коксаки А-4 и 3 штамма Коксаки А-16. На филогенетическом дереве (рис. 1) штаммы вируса Коксаки А-4 сформировали единую монофилетическую группу, возможными предшественниками которой могут быть штаммы, изолированные в Индии и Нижнем Новгороде в 2010 – 2011 годах.

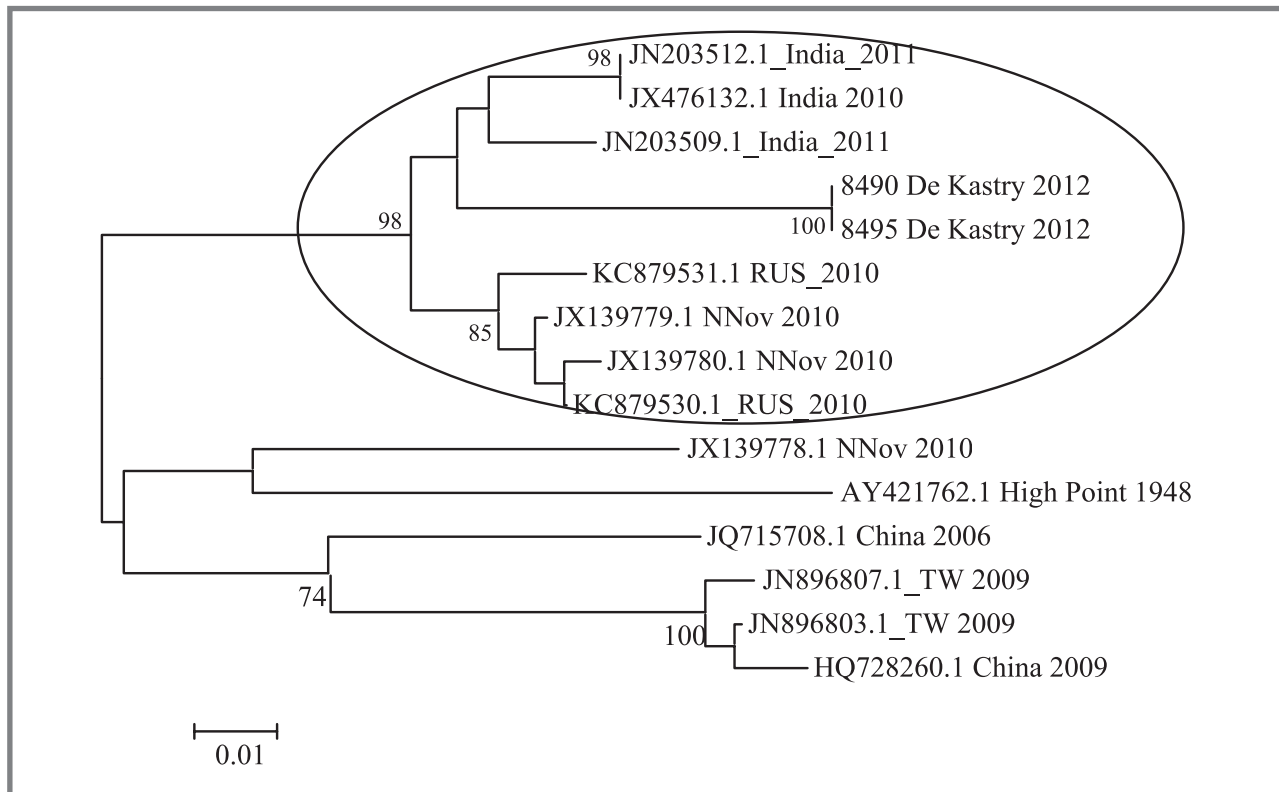
Полученные нуклеотидные последовательности вируса Коксаки А-16, по данным GenBank, оказались генетически близкородственными нуклеотидным последовательностям, выявленным во Франции в 2009 – 2010 годах.

При исследовании биологического материала из поселка Усть-Уркима Тындинского района Амурской области методом ПЦР в 18 из 42 поступивших проб были выявлены РНК энтеровирусов. В результате секвенирования получены 4 нуклеотидные последовательности, которые были идентифицированы как энтеровирусы ЕСНО-6. При филогенетическом анализе полученные штаммы образовали два генетических варианта (рис. 2). Первый вариант ЕСНО-6 был представлен штаммами, выделенными в пос. Усть-Уркима Амурской области и в Хабаровском крае в 2013 году, которые сформировали единую монофилетическую группу, наиболее сходную с изолятами из Екатеринбурга, выделенными в 2006 году. Второй генетический вариант включал штаммы из пос. Усть-Уркима (2013 г.) и штаммы, выделенные в Хабаровске (2011 г.), возможными предшественниками которых были вирусы ЕСНО-6, циркулировавшие на территории Китая в 2010 году. Таким образом, вспышка ЭВИ в пос. Усть-Уркима была вызвана разными вариантами ЕСНО-6.

Из 15 проб биоматериала из г. Райчихинска Амурской области в 12 пробах были обнаружены РНК энтеровирусов. Методом секвенирования была установлена принадлежность 6 полученных нуклеотидных последовательностей к вирусу Коксаки А-6, который в Амурской области ранее не выявлялся. При проведении филогенетического анализа установлено, что все штаммы на 100% идентичны между собой. Они сформировали единую группу, эволюционно близкими к ним оказались штаммы, изолированные в китайской провинции Шанхай и в Таиланде в 2012 году (рис. 3).

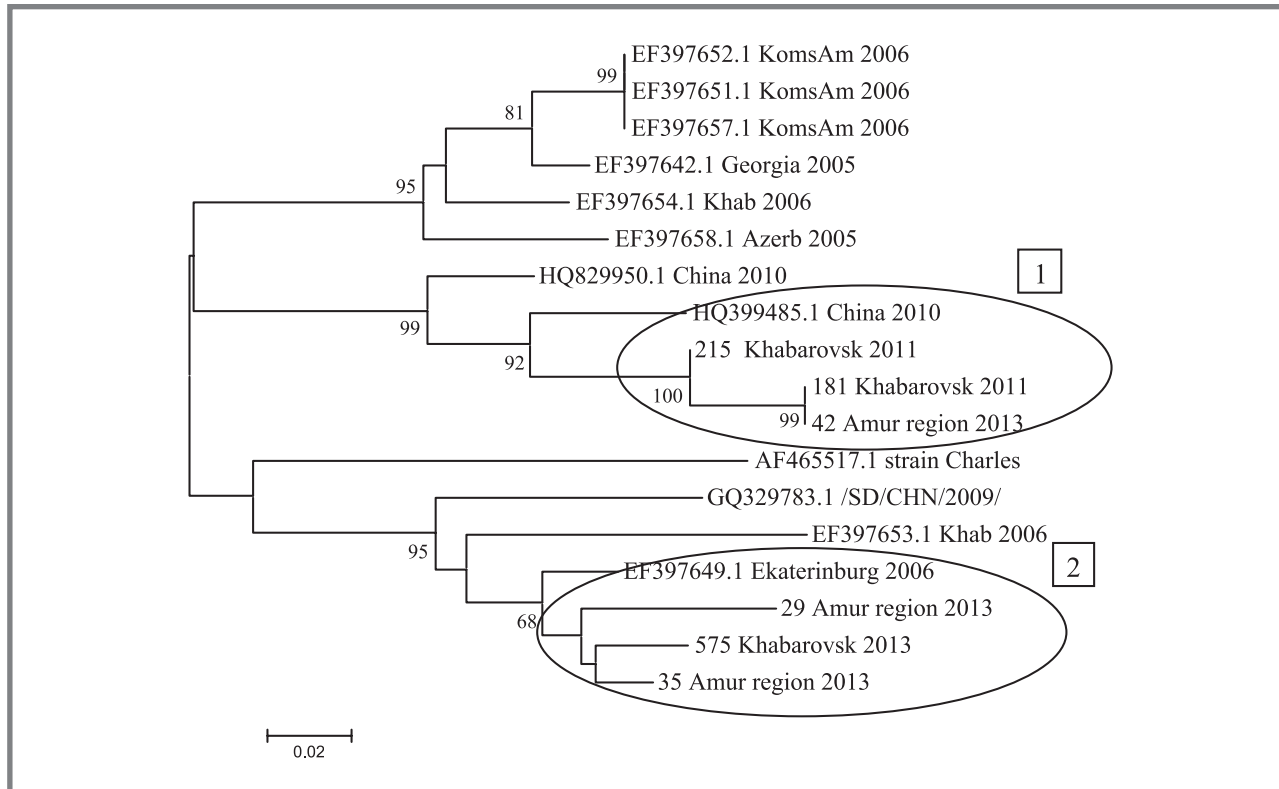
На возможность завоза ЭВИ из Таиланда в г. Райчихинск также указали эпидемиологические данные. Так, родители одного из детей накануне его заболевания прибыли из Таиланда, где была зарегистрирована крупная вспышка ЭВИ, вызванная вирусом Коксаки А-6, имеющим высокую степень гомологии со штаммами, выделенными

**Рисунок 1.**  
**Филогенетическое древо для области генома VP1 вируса Коксаки А-4,**  
**выделенных в п. Де-Кастри Хабаровского края в 2012 году**



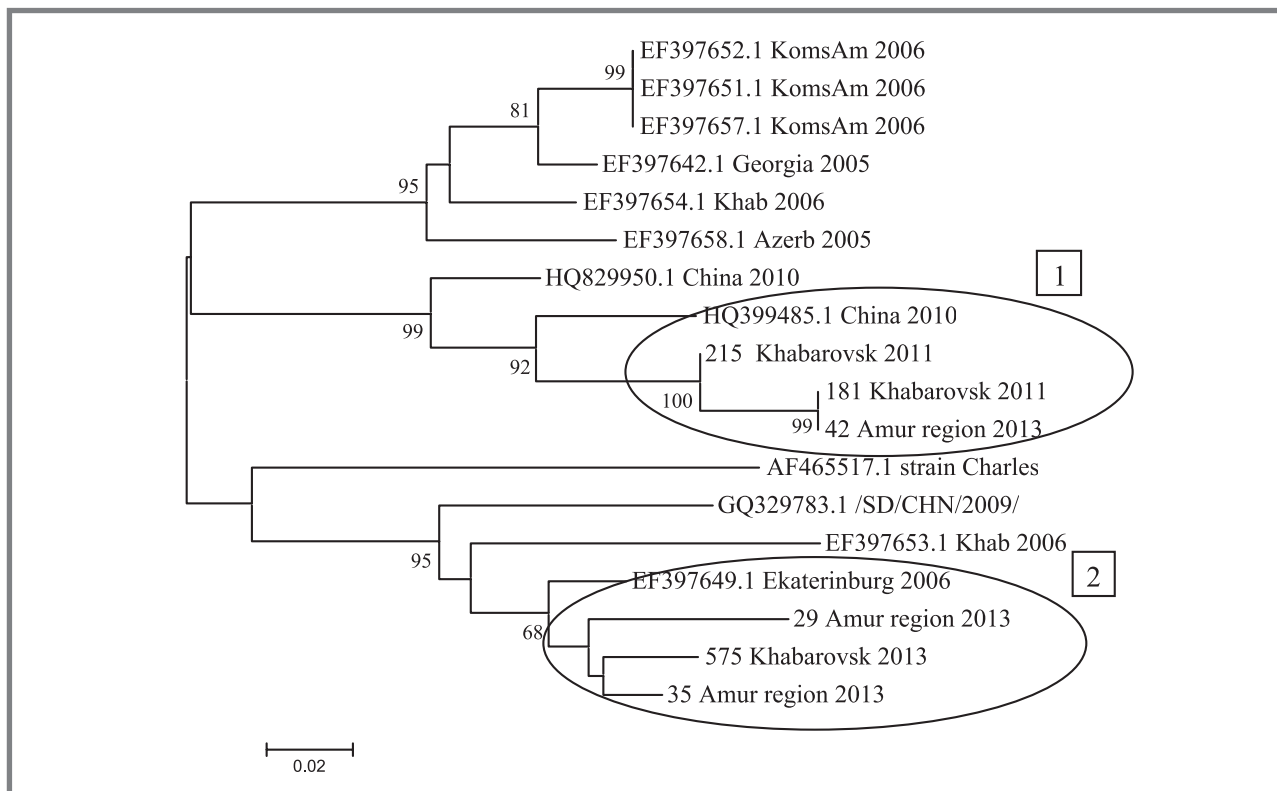
Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию.  
 В левом нижнем углу – шкала генетической дистанции.

**Рисунок 2.**  
**Филогенетические взаимоотношения штаммов ЕСНО 6, выделенных в п. Усть-Уркима Амурской области в 2013 году**



Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. В левом нижнем углу – шкала генетической дистанции.

**Рисунок 3.**  
Филогенетические взаимоотношения штаммов Коксаки А6, выделенных в г. Райчихинске Амурской области в 2013 году



Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. В левом нижнем углу – шкала генетической дистанции.

ми в г. Райчихинске. Следовательно, генетическое родство сравниваемых штаммов в сочетании с данными эпидемиологического расследования позволили предположить участие прибывшего из Таиланда источника в инфицировании в очаге групповой заболеваемости энтеровирусной инфекцией.

Особенностью всех исследованных вспышечных очагов явилось то, что ранее заболеваемость ЭВИ в двух из них (п. Де-Кастри и п. Усть-Уркима) не была зарегистрирована до этого в силу их географической отдаленности и изолированности, а в г. Райчихинске Амурской области заболеваемость ЭВИ не регистрировалась на протяжении трех лет до вспышки (2010 – 2012 гг.). Все это свидетельствует о «завозном» характере возникших заболеваний.

**Выводы**

Молекулярно-генетические методы при эпидемиологических расследованиях случаев вспышечной заболеваемости энтеровирусной инфекцией являются необходимым и важным исследовательским этапом и позволяют:

- идентифицировать генотип возбудителя в конкретном эпидемиологическом очаге;
- доказать или опровергнуть эпидемиологическую связь циркулирующих во время вспышечной заболеваемости энтеровирусов с возникновением вспышечного очага;
- предположить географическое происхождение выявленных генотипов энтеровирусов;
- установить завозные случаи ЭВИ.

**Литература**

1. Иванова О.Е., Лукашев А.Н., Худякова Л.В. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и ее роль в структуре инфекционной патологии в мире. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010; 5: 113 – 120.
2. Сапега Е.Ю., Троценко О.Е., Резник В.И., Перескокова М.А., Каравянская Т.Н., Голубева Е.М. Анализ проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Дальневосточном регионе в 2010 году. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2011; 19: 18 – 22.
3. Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Зуева В.Л., Богуш З.Ф., Дедуля К.Л., Лукашев А.Н. Энтеровирусные инфекции в Республике Беларусь. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014; 19 (5): 37 – 43.
4. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм. Инфекция и иммунитет. 2014; 4 (1): 27 – 36.
5. Троценко О.Е., Каравянская Т.Н., Отт В.А., Онищенко Г.Г., Резник В.И., Сапега Е.Ю. и др. Многолетний анализ проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Хабаровском крае и основные факторы, определяющие ухудшение эпидемиологической ситуации в условиях наводнения. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 75 – 78.
6. Лукашев В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2009.
7. Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification. Journal of Virology. 1999. 73 (3): 1941 – 1948.

8. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. 30: 2725 – 2729.

## References

- Ivanova O.E., Lukashev A.N., Hudyakova L.V. Socio-economic significance of enterovirus infection and its role in the structure of infectious diseases in the world. *Zhurnal microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2010; 5: 113 – 120 (in Russian).
- Sapega E. Yu., Trotsenko O.E., Reznik V.I., Pereskokova M.A., Karavyanskaya T.N., Golubeva E.M. Analysis of the manifestations of the epidemic process of enterovirus infection in the Far East in 2010. *Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patology*. 2011; 19: 18 – 22 (in Russian).
- Amvroseva T.V., Poklonskaya N.V., Zueva V.L., Bogush Z.F., Dedyulya K.L., Lukashev A.N. Enteroviral infections in the Republic of Belarus. *Jepidemiologia i infekcionnye bolezni*. 2014; 19 (5): 37 – 43 (in Russian).
- Kanaeva O.I. Enterovirus infection: variety of etiological factors and clinical manifestations. *Infekcija i immunitet*. 2014; 4 (1): 27 – 36 (in Russian).
- Trotsenko O.E., Karavyanskaya T.N., Ott V.A., Onischenko G.G., Reznik V.I., Sapega E. Yu. et al. Long-term analysis of the manifestations of the epidemic process of enterovirus infection in the Khabarovsk Territory and the main factors determining the deterioration of the epidemiological situation in a flood. *Problemy osobo opasnyh infekcij*. 2014; 1: 75 – 78 (in Russian).
- Lukashov V.V. Molecular evolution and phylogenetic analysis. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2009 (in Russian).
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification. *Journal of Virology*. 1999; 73 (3): 1941 – 1948.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. 30: 2725 – 2729.

## Межрегиональное совещание экспертов по проблеме «Менингококковая инфекция и вакцинопрофилактика»

Совещание состоялось в феврале 2016 года в Москве в рамках XIX Конгресса педиатров России. В нем приняли участие ведущие специалисты в области диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний: Минздрава России, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, академик РАН, проф. Ю.В. Лобзин; член-корреспондент РАН, д.м.н., проф. Л.С. Намазова-Баранова; д.м.н. И.С. Королёва; д.м.н., проф. М.П. Костинов; д.м.н., проф. В.К. Таточенко; д.м.н., проф. К.В. Жданов; д.м.н., проф. С.М. Харит; д.м.н., проф. Л.Н. Мазанкова; д.м.н. проф. И.Я. Извекова; д.м.н., проф. Г.П. Мартынова; д.м.н., проф. И.В. Фельдблюм; д.м.н., проф. Э.Н. Симованьян; д.м.н., проф. Е.С. Гасилина; д.м.н. В.В. Романенко; к.м.н. М.В. Иванова; к.м.н. А.Ю. Ртищев; к.м.н. Д.В. Лопушов. Эксперты обсудили бремя менингококковой инфекции (МИ) в Российской Федерации, разработали рекомендации по стратегии и тактике ее вакцинопрофилактики в РФ в рамках Национального календаря профилактических прививок и региональных программ иммунизации.

Участники совещания отметили, что менингококковая инфекция и в настоящее время остается одной из актуальных проблем здравоохранения. Медико-социальная значимость менингококковой инфекции (МИ) обусловлена преимущественным поражением детского населения, высокой летальностью, значительным процентом инвалидизации после перенесенного заболевания.

Генерализованные формы МИ (менингококковый сепсис, менингит, менингоэнцефалит) протекают наиболее тяжело, практически всегда сопровождаются развитием осложнений и требуют оказания пациентам высокотехнологичной меди-

цинской помощи. Экономические затраты на лечение и последующую реабилитацию таких больных значительны.

Собравшиеся также отметили, что из всех инвазивных бактериальных инфекций генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ) представляют наибольшую опасность для жизни и здоровья ребенка. Это диктует необходимость совершенствования подходов к профилактике, ранней диагностике, оказанию своевременной и эффективной медицинской помощи таким больным, оптимизации системы эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией.

По мнению экспертов, иммунопрофилактика МИ с использованием современных вакцин является наиболее эффективным способом предупреждения заболеваемости, снижения младенческой смертности, инвалидности и распространенности носительства возбудителя в популяции.

Необходимость активного внедрения вакцинопрофилактики МИ в РФ обусловлена непредсказуемостью эпидемиологии данного заболевания, активностью миграционных процессов, создающих предпосылки для интенсивной циркуляции возбудителя, появлением новых гипервирулентных клонов *N. meningitidis*. В то же время появление в последние годы современных эффективных конъюгированных вакцин для профилактики менингококковой инфекции открывает возможность массовой профилактики данного заболевания.

В настоящее время в РФ отмечается длительный межэпидемический период (24 года). Однако столь низкие показатели заболеваемости (0,6 на 100 тыс. человек в 2014 – 2015 г.), высокий уровень циркуляции менингококков группы А (30%), наличие неблагоприятных по МИ территорий, рост забо-