

УДК: 578.835.1[Enterovirus:578.72]:616.9-036.2:001.8

---

## **ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ШТАММОВ НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИ- РУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ, ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИН- ГА**

**А.Г. Сергеев<sup>1</sup>, А.В. Устюжанин<sup>2</sup>, А.В. Резайкин<sup>1</sup>, А.В. Алимов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

<sup>2</sup>Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург

Результаты ежемесячного пятилетнего молекулярно-генетического мониторинга частоты встречаемости непوليوмиелитных энтеровирусов (НПЭВ) в индикаторной группе детей 3-6 лет с бессимптомной формой вирусоносительства на территории крупного промышленного центра позволили зафиксировать существенное отличие спектра серотипов энтеровирусов, обнаруживаемых в группе здоровых лиц и больных энтеровирусным менингитом. Полученные данные свидетельствуют о том, что спектр серотипов НПЭВ, обнаруживаемых у здоровых лиц, не может служить достоверным прогностическим показателем эпидемического процесса. Критерием, позволяющим дать оценку степени вирулентности и эпидемической значимости штаммов НПЭВ, циркулирующих среди населения, может служить соотношение процента выявления определенного серотипа в ликворе больных ЭВМ и частоты его обнаружения в группе клинически здоровых лиц индикаторной группы с бессимптомной энтеровирусной инфекцией.

**Ключевые слова:** циркуляция энтеровирусов, серозный менингит, молекулярно-генетический мониторинг.

**ASSESSMENT OF THE EPIDEMIOLOGICAL RISK STRAINS OF NON-POLIO ENTEROVIRUSES CIRCULATING AMONG THE POPULATION, THE RESULTS OF MOLECULAR-GENETIC MONITORING**

A.G. Sergeev<sup>1</sup>, A.V. Ustyuzhanin<sup>2</sup>, A.V. Rezaikin<sup>1</sup>, A.V. Alimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal budgetary institution of science "Yekaterinburg research Institute of viral infections" of the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare;

<sup>2</sup>State budgetary educational institution of higher professional education "Ural state medical University" Ministry of healthcare of the Russian Federation; Ekaterinburg

The results of monthly 5-years molecular genetic monitoring of nonpoliomyelitis enteroviruses (NPEV) incidence in an indicator group of asymptomatic 3-to-6-years-old virus carriers living in a large industrial centre allowed to reveal a discrepancy between the spikes of NPEV isolation rate from asymptomatic children and the seasonal spikes of enterovirus aseptic meningitis (EVAM) morbidity. Significant difference was observed between the spectra of enteroviral serotypes detected among healthy individuals and the spectra of serotypes detected among EVAM patients. The data obtained indicate that neither the incidence of asymptomatic virus carriers nor the spectrum of NPEV serotypes detected in healthy individuals can be used as a reliable prognostic indicator for epidemic surveillance. The inverse relationship between the proportion of a specific NPEV serotype detected in the CSF samples from EVAM patients and the frequency of its detection among apparently healthy individuals with asymptomatic viral infection from the indicator group provides an estimate for the virulence and epidemic significance of circulating human NPEV strains.

**Keywords:** circulation of enteroviruses, aseptic meningitis, molecular genetic monitoring

Неполиомиелитные энтеровирусы человека (НПЭВ) входят в семейство Picornaviridae, род Enterovirus и включают в себя более ста серотипов, ранее подразделяемых на группы Коксаки А и В, ЕСНО и EV71-110. Согласно современной классификации, основанной на молекулярно-генетических характеристиках, энтеровирусы (ЭВ) человека подразделены на четыре вида (А,В,С,Д). В большинстве случаев заражение протекает в виде бессимптомной инфекции с кратковременным вирусоносительством. Клиническая картина заболеваний, вызываемых НПЭВ, отличается разнообразием симптомов и степени тяжести (диарея, гриппоподобное заболевание, серозный менингит, менингоэнцефалит). Наиболее часто манифестная энтеровирусная инфекция (ЭВИ) протекает в форме серозного энтеровирусного менингита (ЭВМ).

Проблема совершенствования санитарно-эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями до настоящего времени остается актуальной. В г.Екатеринбурге и Свердловской области систематическое наблюдение за заболеваемостью ЭВМ проводится с 1970 года. Отмечено волнообразное течение эпидемического процесса с периодами подъема и снижения заболеваемости, которая по результатам многолетнего наблюдения в несколько раз превышает средние показатели заболеваемости в Российской Федерации. Однако многие вопросы, связанные с краткосрочными и, тем более, долгосрочными прогнозами развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ, остаются нерешенными.

Система Государственного санитарно-эпидемиологического надзора за непوليوмиелитными вирусными инфекциями регламентируется соответствующими нормативными документами (МУ 3.1.1.2363-08, СП 3.1.2950-11 "Профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции") и включает в качестве одного из основных направлений мониторинг циркуляции НПЭВ, который заключается в исследовании клинического материала от больных и проб из объектов внешней среды (сточные воды)

как с помощью традиционного вирусологического метода с использованием клеточных культур, так и с применением методов молекулярной диагностики (ПЦР, секвенирование).

Однако решение основной задачи санитарно-эпидемиологического надзора – прогнозирование развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ остается весьма затруднительным, поскольку до настоящего времени не разработан алгоритм анализа и интерпретации результатов мониторинга и это диктует необходимость поиска новых подходов к повышению информативности методов исследования эпидемического процесса.

Недостаточность информации, получаемой при существующей системе мониторинга циркуляции НПЭВ, для прогнозирования эпидемического процесса становится очевидной при оценке значимости результатов вирусологического исследования клинического материала от больных ЭВИ и проб из объектов внешней среды.

Так, определение спектра возбудителей, обнаруживаемых у больных ЭВИ, позволяет выявить доминирующий этиологический агент, однако оставляет открытым вопрос о степени его вирулентности, что существенно затрудняет прогнозирование развития эпидемического процесса.

Информативность обнаружения энтеровирусов в пробах сточных вод относительно невысока, так как дает лишь весьма приблизительную картину интенсивности циркуляции НПЭВ среди населения. В ряде работ показано преимущественное выделение из сточных вод вакцинных полиовирусов, наличие высокого процента нетипируемых цитопатогенных агентов, несовпадение спектра серотипов, обнаруживаемых в объектах внешней среды и у больных ЭВИ.

Таким образом, несмотря на отлаженную систему мониторинга эпидемической ситуации по заболеваемости ЭВИ открытыми остаются следующие вопросы:

- как связан рост заболеваемости ЭВИ с интенсивностью циркуляции НПЭВ среди населения;
- каково соотношение циркулирующих серотипов НПЭВ с частотой их встречаемости в качестве этиологических агентов ЭВИ;
- по каким критериям можно оценить степень вирулентности циркулирующих штаммов ЭВ.

**Целью** настоящего исследования явилась оценка информативности результатов молекулярно-генетического мониторинга НПЭВ, циркулирующих среди населения, в качестве прогностических показателей развития эпидемического процесса по заболеваемости энтеровирусным серозным менингитом в условиях крупного промышленного центра (г.Екатеринбург).

#### **Материалы и методы**

Всего на предмет обнаружения РНК энтеровирусов в период с июня 2010 г. по ноябрь 2014 г. было исследовано 2114 проб фекалий, полученных методом случайной выборки от клинически здоровых детей в возрасте от 3 до 6 лет, проживающих на территории г. Екатеринбурга (по 30-50 проб в месяц) и 307 образцов ликвора, полученных в тот же период времени от больных с подтвержденным диагнозом: «Энтеровирусный менингит».

Выделение вирусной РНК из исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием комплектов реагентов "РИБО-сорб", "РЕВЕРТА-L-100", "АмплиСенс Энтеровирус-207" производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Генотипирование обнаруженных энтеровирусов осуществляли методом прямого секвенирования последовательностей участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по описанной ранее методике [4] и дальнейшего их сравнения с помощью программы BLAST с последовательностями, депонированными в международном банке генетической информации NCBI GenBank.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). Достоверность отличий в распределении частоты встречаемости серотипов оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ .

#### **Результаты исследования**

Из 2114 образцов фекалий от детей индикаторной группы, исследованных методом ПЦР, РНК НПЭВ была обнаружена в 226 пробах, что составило 10,7%. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, процент вирусовыделителей среди детей индикаторной группы из года в год менялся незначительно. При этом типовой состав обнаруженных возбудителей отличался разнообразием и претерпевал существенные изменения. Всего за период наблюдения была зафиксирована циркуляция 25 серотипов НПЭВ. В 2012 и 2013 гг., когда удалось типировать наибольшее количество штаммов, были выявлены 10 и 13 серотипов НПЭВ, соответственно. Следует отметить, что наиболее разнообразный пейзаж был представлен вирусами Коксаки А (12 из 25 серотипов), которые ранее чрезвычайно редко удавалось обнаружить с помощью вирусологического метода исследования [1,2].

Таблица 1.

**Результаты исследования образцов фекалий клинически здоровых детей в возрасте 3-6 лет на наличие неполиомиелитных энтеровирусов**

Год	Кол-во проб	Обнаружено		Типировано		Серотипы
		Абс.	%	Абс.	%	
2010	156	22	14,1	3	13,6	A1, B1, E25
2011	237	24	10,12	7	29,2	A1, 2, 5, 9, 13, EV77
2012	753	86	11,4	35	40,6	A 4, 9,21,22, B3, 5, E3,6,18,25
2013	630	62	9,8	30	48,4	A 2,4,5,9,17,19,21,22, B4,2, E11,25,30
2014	338	32	9,5	9	28,17	A 4, 8, 22,24, B5, E14
Всего	2114	226	10,7	84	37,2	

Примечательно, что ни один из идентифицированных НПЭВ не обнаруживался ежегодно на протяжении четырех и более лет. Только один из серотипов (Коксаки А9) был изолирован в течение трех лет подряд и 6 серотипов обнаруживались в течение двух лет подряд (Коксаки А1,4,21,22; Коксаки В3; ЕСНО 25). Эти данные ни в коей мере не могут свидетельствовать о прекращении циркуляции того или иного серотипа на определенной территории. Скорее всего, они являются свидетельством повышения или снижения интенсивности их циркуляции.

Появление доминирующего серотипа среди циркулирующих штаммов удалось зарегистрировать только в 2012 г., когда из 35 идентифицированных НПЭВ, представленных 10 серотипами, в 14 случаях (40%) был выявлен вирус ЕСНО6. Активная циркуляция этого вируса была зафиксирована с июля по ноябрь включительно.

При сравнении показателей помесечной заболеваемости серозным менингитом (на 100 тыс. детей 3-6 лет) и частоты обнаружения НПЭВ у детей индикаторной группы было установлено, что пиковые значения показателя заболеваемости в период наблюдения колебались в широких пределах: от 19 (2010 г.) до 170,7 (2013 г.) на 100 тысяч детей возрастной группы 3-6 лет. В то же время, среднегодовая частота бессимптомного вирусоносительства в течение всего периода наблюдения оставалась практически на одном уровне (9,5-14%), а пиковые значения этого показателя в летне-осенний период составляли около 20%, за исключением октября 2013 г., когда частота обнаружения НПЭВ у клинически здоровых детей достигла 37%. Повышение уровня циркуляции ежегодно опережало рост показателя заболеваемости, что хорошо согласуется с данными литературы [3]. Однако сроки этого опережения в разные годы существенно различались и составляли от одного (2013, 2014 г.г.) до четырех месяцев (2010 г.).

Наиболее существенная с точки зрения оценки эпидемиологической значимости отдельных серотипов информация была получена в результате сравнительного анализа спектра и частоты выявления серотипов НПЭВ у клинически здоровых лиц и больных ЭВМ (табл. 2).

Таблица 2.

**Серотипы неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженные у клинически здоровых вирусоносителей и больных энтеровирусным менингитом**

Группа НПЭВ	Серотипы НПЭВ							
	2011г.		2012г.		2013г.		2014г.	
	ЗД	ЭВМ	ЗД	ЭВМ	ЗД	ЭВМ	ЗД	ЭВМ
Коксаки А	1,2,5,6, 9,13,22	9	4,9,21,2 2	9	2,4,5,9,17, 19 21,22	9	4,8,22, 24	9
Коксаки В	-	-	3,5	1,2,3,4,5	2,4	2,3,4,5	5	4,5
ЕСНО	-	6,9,17,1 8	<b>6(40%)</b> 3,18,25	<b>5, 6(41,1%)</b> 7 14,18,25,30	11,25 30(11,5%)	6, 8,9,11,14, <b>30 (58,5%)</b>	14	2,14,1 8 <b>30 (59%)</b>
EV77	1	-	-	-	-	-	-	-
Всего се- ротипов	8	5	10	13	13	11	6	7

\* - здоровые вирусоносители

Полужирным курсивом обозначены доминирующие серотипы НПЭВ

Как видно из представленных данных, наиболее разнообразный спектр серотипов вирусов Коксаки А был выявлен в группе здоровых вирусоносителей, тогда как в ликворе больных на протяжении пяти лет обнаруживался только вирус Коксаки А9.

Вирусы Коксаки В обнаруживались относительно редко как в группе больных, так и у здоровых лиц и не имели особой эпидемиологической значимости.

Среди вирусов, относящихся к группе ЕСНО, на протяжении трех лет наблюдения отмечался более широкий спектр серотипов, выделенных от больных по сравнению с группой здоровых.

В целом, можно отметить, что все ЭВ, выделенные от больных, относились к виду В, тогда как у вирусоносителей обнаруживались серотипы, принадлежащие видам А, В и С.

Обращает на себя внимание тот факт, что в 2012 году доминирующим серотипом, изолированным как от больных, так и от здоровых лиц практически в равном проценте случаев (41,1% и 40%, соответственно), был вирус ЕСНО6 (p=0,95). В 2013 дальнейший подъем заболеваемости был связан с активным включением в циркуляцию вируса ЕСНО30, на долю которого приходилось около 60% случаев серозного менингита. При этом следует особо отметить, что от здоровых носителей данный серотип выделялся в 5 раз реже в 2013 г. (58,5% и 12%, соответственно, p=0,001) и не был обнаружен ни в одном случае в 2014 г.

В 2012 г. во время эпидемического подъема заболеваемости ЭВМ (показатель -147 на 100 тыс. детей индикаторной группы) среди штаммов, обнаруженных в ликворе больных, преобладал вирус ЕСНО 6 (41,1%). Доля указанного серотипа среди НПЭВ, обнаруженных в этот период у вирусоносителей практически не отличалась и составляла 40%.

В 2013 г. эпидемический подъем заболеваемости (показатель - 364,3 на 100 тыс. детей индикаторной группы) был связан с активным включением в циркуляцию вируса ЕСНО30, на долю которого приходилось 58,5% случаев ЭВМ. Пик заболеваемости в 4 раза превысил показатель предыдущего года (40,8) и достиг уровня 170,7 на 100 тыс. детей индикаторной группы. При этом следует особо отметить, что среди идентифицированных энтеровирусов, выделенных от здоровых носителей, частота встречаемости вируса ЕСНО30 составляла 12%, то есть была в 5 раз ниже, чем выявляемая в ликворе больных ЭВМ (рис. 1).

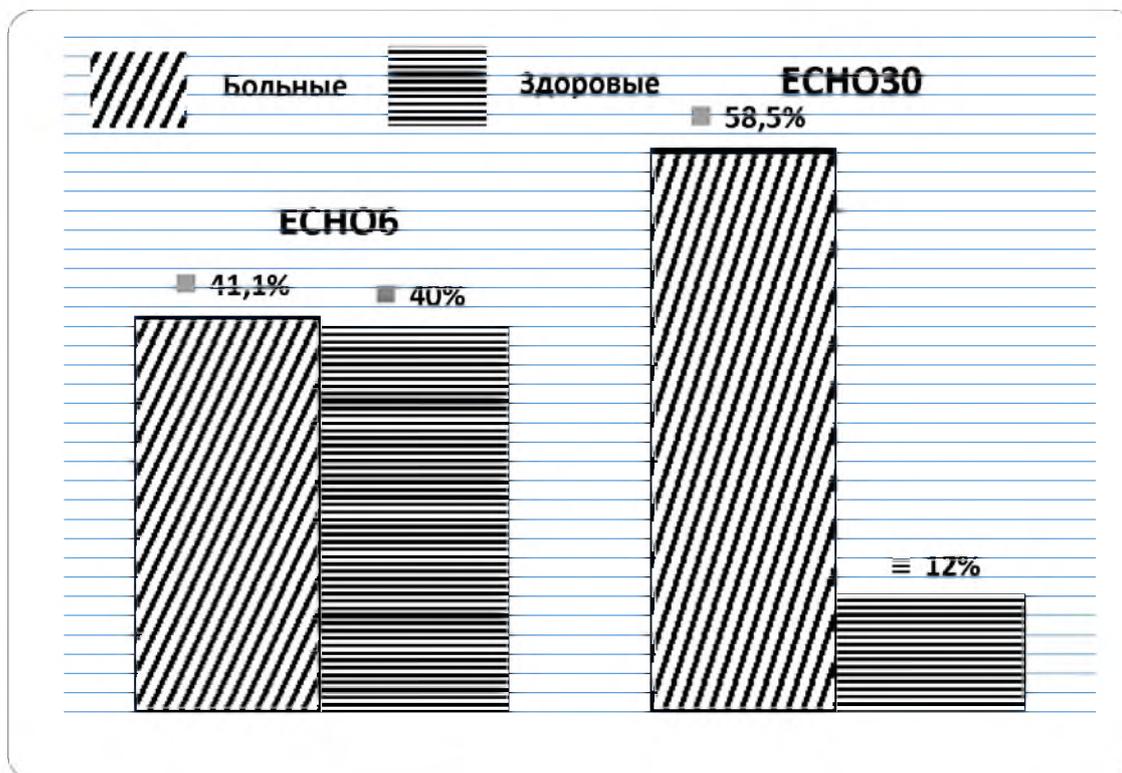


Рисунок 1. Частота встречаемости доминирующих этиологических агентов энтеровирусного менингита среди серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у больных и клинически здоровых лиц.

Такое существенное различие в частоте обнаружения штамма энтеровируса в группах больных и здоровых лиц является убедительным свидетельством в пользу высокой вирулентности включившегося в циркуляцию в 2013 г. штамма вируса ЕСНО30, который в течение последних трех лет не обнаруживался на территории г. Екатеринбурга.

Зная долю доминирующего серотипа в этиологической структуре заболеваемости и процент его обнаружения у здоровых вирусоносителей можно получить дополнительную информацию о степени его эпидемиологической опасности путем вычисления показателя риска развития заболевания. Таким показателем является количество инфицированных с бессимптомной или субклинической формой инфекции, приходящихся на один случай заболевания. Известно, что для паралитического полиомиелита, вызванного вирулентными штаммами во время эпидемии, этот показатель составляет, в среднем, 100:1[5].

В результате соответствующих вычислений было установлено, что риск развития ЭВМ у инфицированных вирусом ЕСНО 6 в 2012 г. составил 1: 76, тогда как для инфицированных вирусом ЕСНО 30 в эпидемическом сезоне 2013 г. он был почти в 14 раз выше и составлял 1:5,6 (табл. 3).

Таблица 3.

**Расчет соотношения количества инфицированных на один случай заболевания энтеровирусным менингитом у детей индикаторной группы в возрасте 3-6 лет**

Год	Заболеть (на 1000)	Доминирующий серотип	Доля доминирующего серотипа у больных ЭВМ (%)	Заболеть по домин-му серотипу (на 1000)	Вирусоносительство (на 1000)	Доля доминирующего серотипа у носителей (%)	Носительство доминирующего серотипа (на 1000)	Соотношение кол-ва инфицированных на 1 случай заболевания
2012	1,47	E6	41,1	0,6	114	40	45,6	76:1
2013	3,64	E30	58	2,1	98	12	11,7	5,6:1

Полученные данные отражают степень вирулентности включившихся в циркуляцию НПЭВ и позволяют более достоверно оценить вероятность развития неблагоприятной эпидемиологической ситуации.

**Заключение**

Включение в программу молекулярно-генетического мониторинга НПЭВ исследований по определению частоты встречаемости отдельных серотипов, циркулирующих на данной территории среди практически здоровых детей в возрасте от 3 до 6 лет, дает информацию, позволяющую вычислить значения эпидемиологической значимости отдельных штаммов и показателей риска неблагоприятного развития эпидемиологической ситуации по заболеваемости энтеровирусным серозным менингитом. Одним из таких показателей является многократное преобладание частоты выявления доминирующего серотипа в ликворе больных с клиникой серозного менингита, по сравнению с частотой его обнаружения в фекалиях здоровых вирусовыделителей. Другим показателем является число вирусовыделителей доминирующего этиологического агента, приходящееся на один случай ЭВМ, вызванного данным серотипом. Проведенные исследования дают основания для разработки алгоритма составления краткосрочного прогноза развития эпидемиологической ситуации по заболеваемости серозным менингитом.

**Литература**

1. Иванова О. Е., Еремеева Т. П., Байкова О. Ю. Исследование сточных вод в доме ребенка как подход к надзору за циркуляцией полиовирусов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. - №1. – С. 12-16.
2. Проскуракова Н. Б. К вопросу о выделении вирусов из фекалий у здоровых людей // Вопросы вирусологии. – 1969. - №3. - С. 356-360.

3. Снитковская Т. Э. Роль унифицированной системы вирусологического мониторинга в эпидемиологическом надзоре за полиомиелитом и энтеровирусными инфекциями в крупном промышленном регионе: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2013. – 24 с.

4. Устюжанин А.В., Резайкин А.В., Снитковская Т.Э., и др. Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г. Екатеринбург и Свердловской области в 2008 г. // Уральский медицинский журнал. - 2011. - №13(91). - С. 19-24.

5. Melnick J.I., Ledinko N. Development of neutralizing antibodies against the three types of poliomyelitis virus during an epidemic period; the ratio of inapparent infection to clinical poliomyelitis // Am J Hyg. – 1953. - Sep;58(2). P. 207–222.

**Сведения об авторах**

**Сергеев Александр Григорьевич** -д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, E-mail: virus@eniivi.ru,

**Устюжанин Александр Владимирович** - ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, E-mail: ust103@yandex.ru,

**Резайкин Алексей Васильевич** - к.м.н., руководитель лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, E-mail: virus@eniivi.ru.