

УДК: 578.7:578.835.1[Enterovirus]:001.8(571.6)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.Ю. Сапега¹, Л.В. Бутакова¹, В.О. Котова¹, О.Е. Троценко¹,
Т.А. Зайцева², О.П. Курганова³, М.Е. Игнатьева⁴,
Ю.А. Гарбуз⁵, Б.Б. Дарижапов⁶, В.А. Янович⁷

¹ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора;

²Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю;

³Управление Роспотребнадзора по Амурской области;

⁴Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия);

⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае»;

⁶Управление Роспотребнадзора по Сахалинской области;

⁷Управление Роспотребнадзора по Еврейской автономной области

В статье приведены результаты филогенетического анализа 5-ти разновидностей штаммов энтеровирусов, циркулирующих на территории Дальневосточного федерального округа Российской Федерации (Коксаки А-6, ЕСНО-18, ЕСНО-30, Коксаки В-4 и Коксаки В-5).

На основе филогенетических взаимоотношений установлены возможные эпидемиологические связи с аналогичными серотипами энтеровирусов, выявленными в других странах.

Ключевые слова: филогенетический анализ, энтеровирусы, эпидемиологическая связь

MOLECULAR-GENETIC VARIABILITY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ENTEROVIRUS STRAINS, CIRCULATING ON THE TERRITORY THE FAR EAST FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION

E.Yu. Sapega¹, L.V. Butakova¹, V.O. Kotova¹, O.E. Trotsenko¹, T.A. Zaitseva², O.P.Kurganova³, M.E. Ignat'eva⁴, Yu.A. Garbuz⁵, B.B. Darizhapov⁶, V.A. Yanovich⁷

¹*Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance (Rosbotrebnadzor),*

²*Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance of Khabarovsk Region*

³*Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance of Amur Oblast*

⁴*Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance of the Sakha (Yakutia) Republic*

⁵*Khabarovsk Region hygiene and epidemiology center*

⁶*Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance of Sakhalin Oblast*

⁷*Administration of Federal service on customer's rights protection and human well-being surveillance of Jewish Autonomous Region*

This article describes the results of the phylogenetic analysis of five strains of enteroviruses, circulating in the Far East Federal District of the Russian Federation (Coxsackie A-6, echovirus-18, echovirus-30, Coxsackie B-4 and Coxsackie B-5). Epidemiological links were established with similar enterovirus serotypes identified in other countries.

Key words: phylogenetic analysis, enteroviruses, epidemiological link.

С наступлением летнего сезона в некоторых регионах Дальневосточного Федерального округа Российской Федерации (ДФО РФ) наблюдается подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ). Наибольшие показатели отмечаются в крупных городах и в южных регионах округа. Ежегодный рост заболеваемости связан со многими факторами, такими, как купание в водоемах, употребление некипяченой воды и близкие контакты с инфицированными ЭВИ. Одной из причин значительного подъема заболеваемости ЭВИ, по данным литературы, является смена одного серотипа энтеровируса на другой, что может указывать на завозной характер вспышки. Расширение туристических связей способствует распространению энтеровирусов по всем территориям ДФО РФ, в результате чего наблюдается подъем заболеваемости ЭВИ не только в эндемичных районах, но и в тех регионах, где ранее энтеровирусная инфекция не регистрировалась.

Наиболее быстрым, доступным и достоверным методом диагностики энтеровирусной инфекции в настоящее время является молекулярно-генетический метод, который позволяет не только установить серотип энтеровируса, но и выявить эпидемиологические связи. Изучение молекулярной эпидемиологии энтеровирусов способствует определению филогенетических взаимоотношений между выделенными штаммами и установлению общего источника инфекции при вспышках, а также позволяет выявить завозные случаи [1].

Цель исследования

Изучить штаммы энтеровирусов, циркулирующих на территории ДФО, и выявить филогенетические взаимоотношения эпидемически значимых для ДФО энтеровирусов с аналогичными штаммами, выделенными в других странах.

Материалы и методы

Для молекулярно-генетического исследования в лабораторию Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора в 2014 году поступило 220 проб клинического материала от больных и пробы внешней среды из 6-ти территорий ДФО, где регистрировались случаи энтеровирусной инфекции: из Хабаровского края, Республики Саха (Якутия), Амурской области, Еврейской автономной области (ЕАО), Сахалинской области и Камчатского края.

Выделение РНК неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) осуществляли с помощью коммерческого набора «Рибо-Преб» «Амплисенс» производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием набора Reverta-L «Амплисенс» того же производителя.

Амплификацию и секвенирование участков VP1-кодирующего региона генома НПЭВ проводили с помощью нескольких наборов праймеров, рекомендуемых M.S. Oberste и соавторами [2, 3]. Для типового определения штаммов проводилось секвенирование участка генома VP1 на автоматическом ДНК-анализаторе «Applied Biosystems 3500 Avant» (Amersham Biosciences).

Поиск прототипных штаммов в базе данных GenBank осуществлялся с помощью интернет-программы BLAST. Компьютерный анализ последовательностей проводили с помощью программы MEGA, версии 6 [5]. Генетические расстояния между последовательностями определяли на основании модели нуклеотидных замен Tamura-Nei [4]. Реконструкция филогенетических древ проводилась с помощью алгоритма neighbor-joining, встроенного в MEGA.

В базу данных GenBank были депонированы 24 нуклеотидные последовательности части генома VP1 вируса Коксаки А-6 под номерами доступа KR014381, KR014382, KR014383, KR014384, KR014385, KR014386, KR014387, KR014388, KR014389, KR014390, KR014391, KR014392, KR014393, KR014394, KR014395, KR014396, KR014397, KR014398, KR014399, KR014400, KR014401, KR014402, KR014403, KR014404.

Результаты исследования и обсуждение

В лаборатории Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ молекулярно-генетическими методами в 2014 году было типировано 220 штаммов энтеровирусов, циркулирующих на территории Дальнего Востока России, из них 7 штаммов полио-1,3 (табл.1).

Таблица 1.

Вирусы, идентифицированные у пациентов с ЭВИ и в объектах окружающей среды в 2014 году

Тип вируса		Территории ДФО					
		Хабаровский край	Амурская область	Сахалинская область	ЕАО	Республика Саха (Якутия)	Всего
Коксаки В	2	7					7
	3			3			3
	4	4	3		2	6	15
	5	8	1		3		12
Коксаки А	1		1				1
	2	10				5	15
	4	2			1		3
	5	5				3	8
	6	22		2	4	19	47
	8	3					3
	9	4					4
	10				2	4	6
	14		1				1
	16		1			3	4
	19	1	1				2
	24				2		2
ЕCHO	3	1					1
	6	4					4
	9				7		7
	14					1	1
	18	25			6		31
	20	3					3
	21	1					1
	25	2			1		3
	30	7	1			16	24
	71	5					5
Полио	1, 3	2			1	4	7
Итого		116	9	5	29	61	220

Распределение серотипов энтеровирусов по территориям представлено следующим образом: в Республике Саха (Якутия) в 2014 году циркулировало 9 серотипов энтеровирусов, среди которых преобладали Коксаки А-6 и ЕCHO-30 (31,1% и 26,2% соответственно). В ЕАО из 10 серотипов энтеро-

вирусов ЕСНО-9 был идентифицирован в 24,1%, а ЕСНО-18 – в 20,7% случаев. В Хабаровском крае энтеровирус ЕСНО-18 был выявлен у 21,5% больных, Коксаки А-6 – у 19,0%, на долю Коксаки А-2 пришлось 8,6% от общего количества типированных в крае штаммов энтеровирусов. В Амурской области идентифицировано всего 7 серотипов энтеровирусов (Коксаки В-4,5, Коксаки А-1,14,16,19, ЕСНО-30), в Сахалинской области - 2 серотипа (Коксаки А-6 и Коксаки В-3).

Для наиболее эпидемически значимых энтеровирусов был проведен филогенетический анализ. Следует отметить, что энтеровирус Коксаки А-6 встречался в 21,4% случаев и был выявлен в 4-х территориях ДФО: в Хабаровском крае, Республике Саха (Якутия), ЕАО и Сахалинской области.

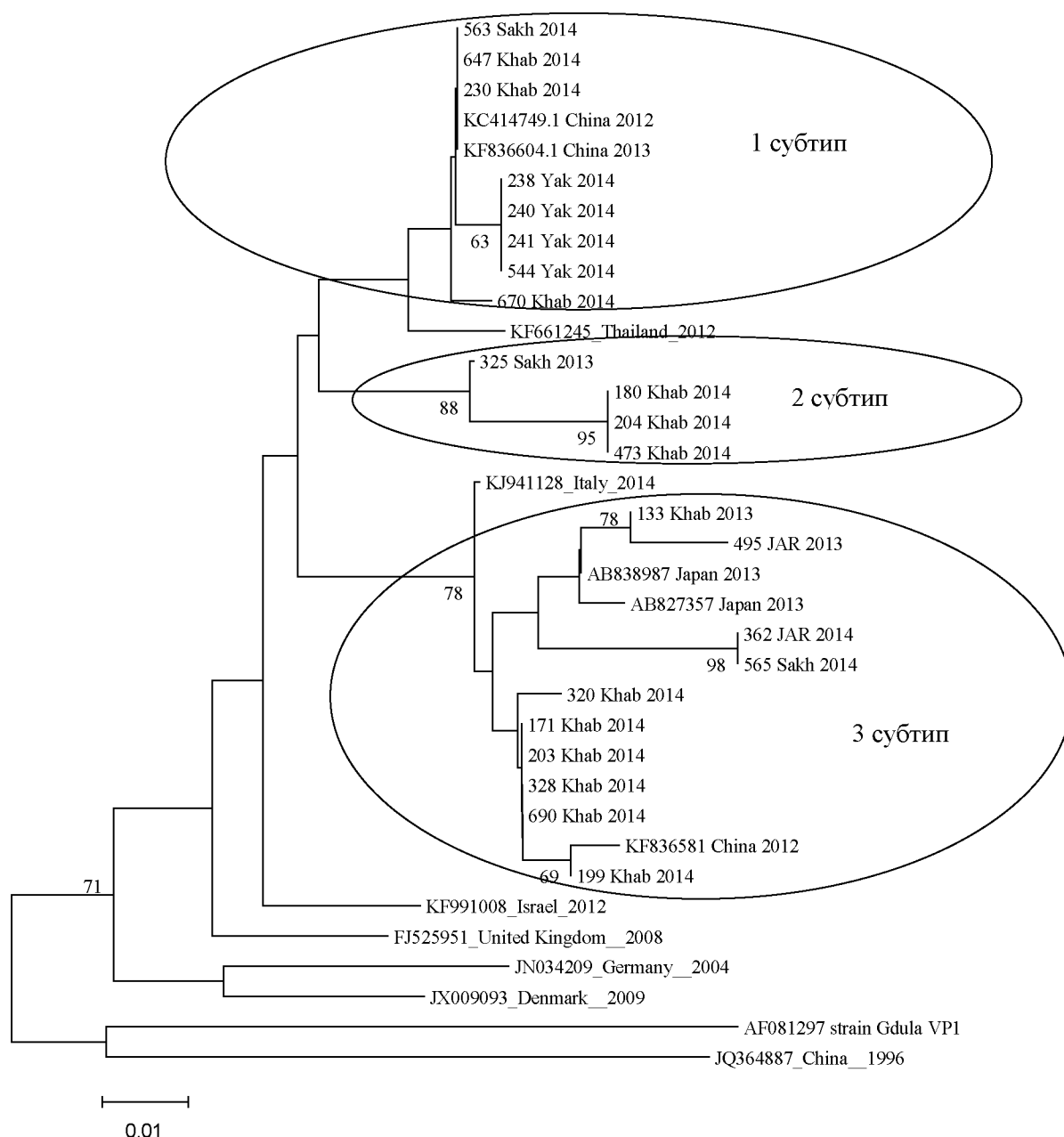


Рис.1. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов Коксаки А-6, выделенных в 2014 году в Хабаровском крае, республике Саха (Якутия), ЕАО и Сахалинской области, и нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank.

Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореplik, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния.

На филограмме штаммы Коксаки А-6 представлены 3-мя субтипами (рис.1). В первый субтип вошли хабаровские, сахалинские, якутские штаммы и штаммы, выделенными в Китае в 2012-2013 годах. Штаммы Коксаки А-6, выделенные от больных г. Хабаровска в 2014 году и Сахалинской области в 2013 году, образовали вторую единую группу (второй субтип), не имеющую сходных аналогов в

базе данных GenBank. Вирусы Коксаки А-6 третьего субтипа, состоящие из штаммов г. Хабаровска, Сахалинской области и ЕАО, выделенных в 2014 году, были наиболее сходны со штаммами, изолированными в Китае в 2012 году и в Италии в 2014 году. Таким образом, на территории Дальнего Востока в 2014 году циркулировали энтеровирусы Коксаки А-6 разного происхождения.

Полученные данные свидетельствуют о генетическом разнообразии Коксаки А-6, его широкой циркуляции среди населения не только Дальнего Востока России, но и зарубежных стран. Туристическая активность граждан способствует проникновению энтеровируса в другие страны и приводит к спорадическим заболеваниям или даже к возникновению вспышек.

Энтеровирус ЕСНО-18 редко встречается среди циркулирующих штаммов на Дальнем Востоке. В Хабаровском крае в 2007 году на культуре клеток было выделено 18 изолятов, в 2013 году - 1 изолят. В 2014 году при исследовании клинического материала от больных серозно-вирусным менингитом из г. Комсомольска-на-Амуре Хабаровского края методом секвенирования выявлен штамм энтеровируса ЕСНО-18. На филограмме комсомольские штаммы ЕСНО-18 сформировали единую группу, незначительно отличающуюся от штаммов, выделенных от больных г. Хабаровска и ЕАО, а возможными их предшественниками явились штаммы, изолированные во Франции в 2011-2012 годах, что свидетельствует об их «европейском» происхождении (рис.2.).

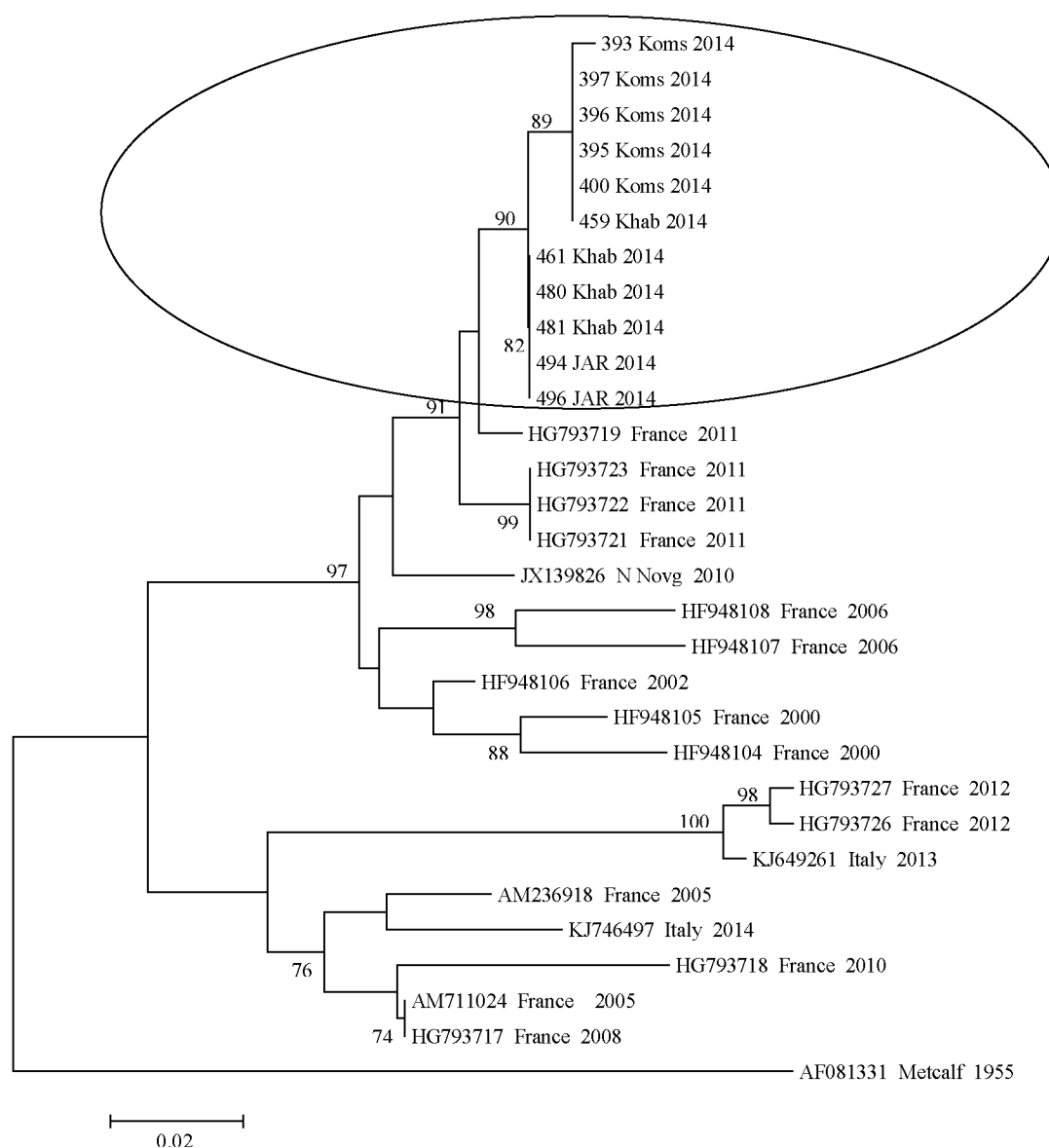


Рис.2. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов ЕСНО-18, выделенных в 2014 году в Хабаровском крае и ЕАО, и нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank.

Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния.

На третьем месте по частоте выделения энтеровирусов из клинического материала стоит вирус ЕСНО-30. Энтеровирус ЕСНО-30 в 2014 году циркулировал на территории Хабаровского края, ЕАО и Республики Саха (Якутия). Филогенетический анализ выявил разделение штаммов ЕСНО-30 на 3 субтипа (рис. 3). Первый субтип включал штаммы ЕСНО-30, выделенные в г. Хабаровске и ЕАО, совместно со штаммом, циркулировавшим на территории Китая в 2010 году. Второй субтип представлен якутскими вирусами и штаммом, выделенным в Китае в 2011 году (рис.3).

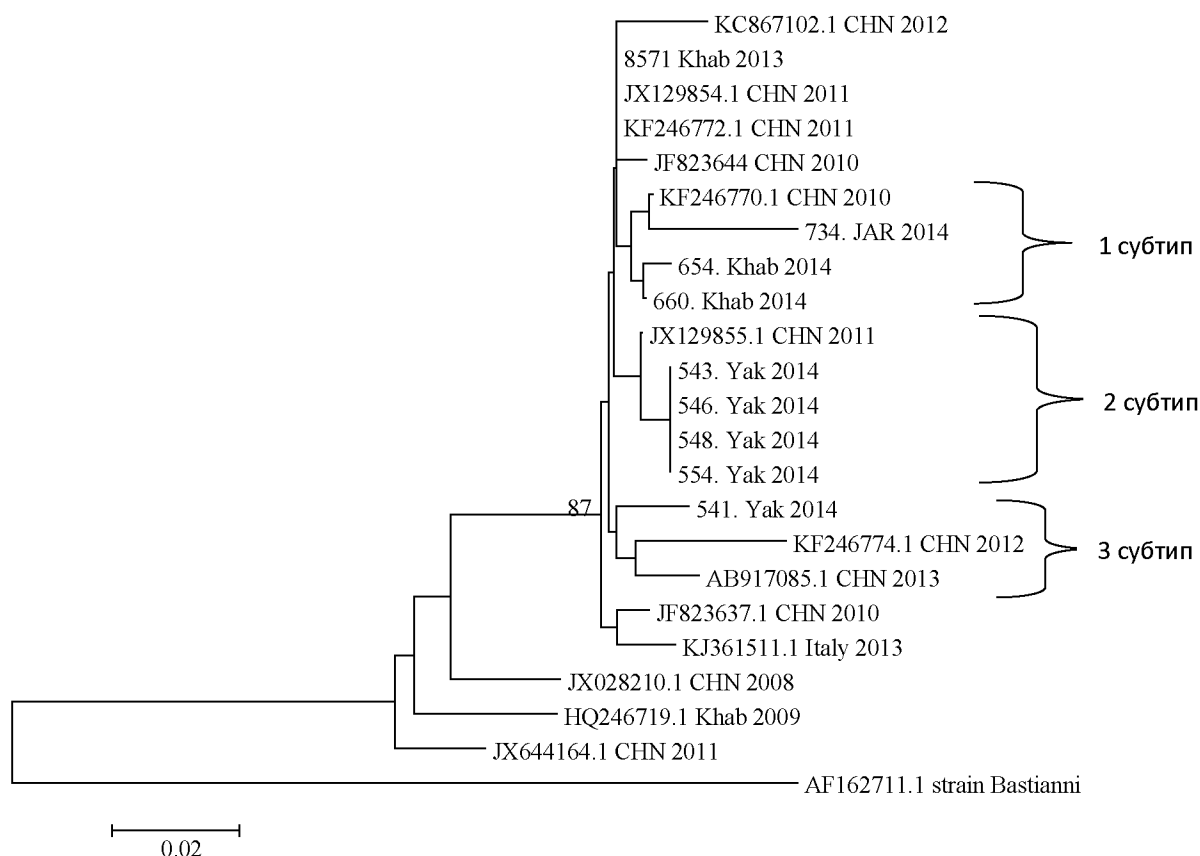


Рис.3. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов ЕСНО-30, выделенных в 2014 году в Хабаровском крае, Республике Саха (Якутия), ЕАО и Сахалинской области, и нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank.

Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния.

Один изолят ЕСНО-30 третьего субтипа №541.Yak.2014, от больного из Республики Саха (Якутия), сформировал группу с вирусами, циркулировавшими в Китае в 2012-2013 годах.

Энтеровирус Коксаки В-4 в 2014 году был выделен от детей в возрасте до 2-х лет в Республике Саха (Якутия), Амурской области, ЕАО и в Хабаровском крае. В Амурской области этот штамм был изолирован и из проб сточной воды, что свидетельствует об его активной циркуляции среди населения области. Выделенные штаммы совместно со штаммами из GenBank сформировали 3 различных по территориальному происхождению субтипа (рис. 4). Так, штаммы из ЕАО совместно с китайскими штаммами 2010 года составили отдельную группу, что свидетельствует об их «китайском» происхождении.

Второй субтип представлен вирусами, выделенными в Амурской области и Республике Саха (Якутия), возможными их предшественниками были штаммы, циркулировавшие в Японии в 2011 году. Штаммы Коксаки В-4, выделенные от больных города Хабаровска, оказались идентичными штаммам, циркулировавшим на территории России в 2010 году, и совместно с ними вошли в состав третьего субтипа.

В последние годы энтеровирус Коксаки В-5 является основной этиологической причиной подъема заболеваемости энтеровирусной инфекции в Хабаровском крае. В 2014 году энтеровирус Коксаки В-5 был выделен от больных Хабаровского края и ЕАО, а также из проб сточной воды г. Белогорска Амурской области (рис. 5).

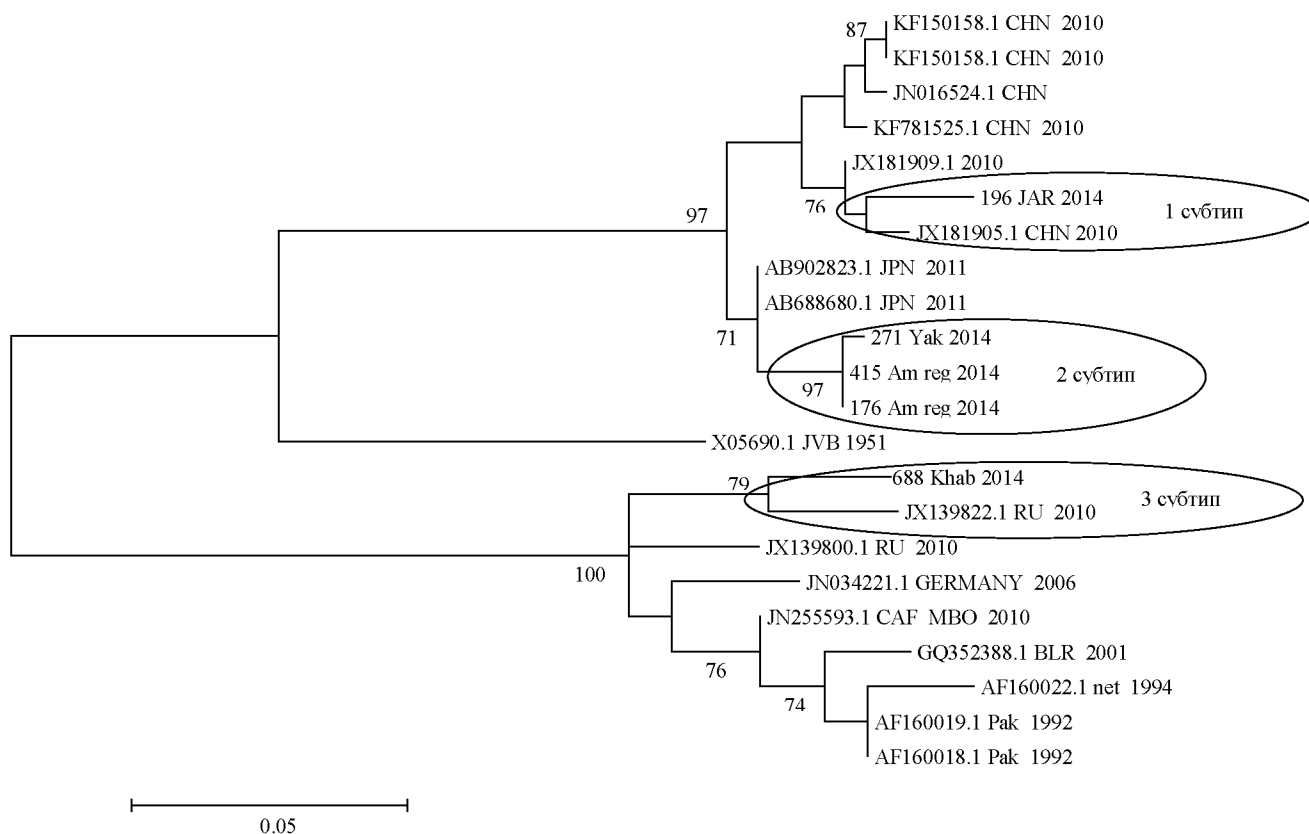


Рис.4. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов Коксаки В-4, выделенных в 2014 году в Хабаровском крае, ЕАО, Амурской области и республике Саха (Якутия), и нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank.

Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния.

При сравнительном анализе установлено 100%-ное сходство между двумя хабаровскими штаммами (№№ 440 и 486), а также между хабаровским штаммом (№642) и штаммом из Амурской области (№731st), отличие между этими двумя группами составило 1,2%. Штаммы, выделенные в ЕАО, отличались от хабаровских штаммов на 1,2-2,3%. С учетом того, что для участка генома VP1 характерна высокая скорость эволюции (1% замены в год), вполне вероятно предположить разный источник инфицирования у этих больных. Идентичные штаммы Коксаки В-5 были выделены в Китае в 2011 году и в России (в Мурманской области) в 2012 году, при этом показатель идентичности составил 97%. На филограмме указанные штаммы 2014 года сформировали единую группу, возможными предшественниками которой были вирусы, изолированные в Китае в 2009-2010 годах и в России в 2012 году.

Выводы

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического типирования на территории ДФО РФ в 2014 году циркулировало 27 серотипов энтеровирусов, из них наиболее часто встречались Коксаки А-6 (21,4%), ЕСНО-18 (14,1%), ЕСНО-30 (11,0%), Коксаки В-4 (6,8%) и Коксаки В-5 (5,5%). Вирусы Коксаки А-6, Коксаки В-4 и ЕСНО-30 дифференцировались на 3 генетических субтипа в пределах одного генотипа. Вирусы ЕСНО-18 и Коксаки В-5 принадлежали к одному генотипу без разделения на субтипы. Выявленные генетические варианты проанализированных энтеровирусов были филогенетически близки штаммам, циркулировавшим на территории Российской Федерации и в странах ближнего и дальнего зарубежья, что свидетельствует об их широком географическом распространении.

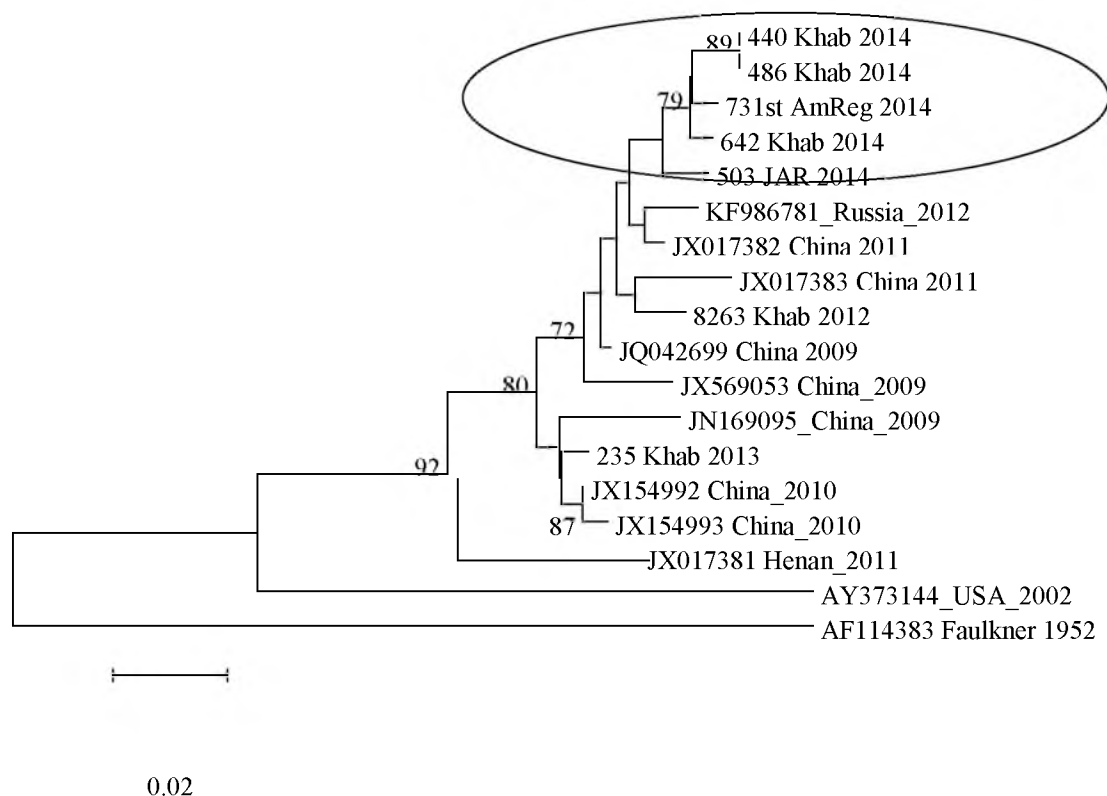


Рис.5. Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов Коксаки В-5, выделенных в 2014 году в Хабаровском крае и ЕАО, и нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank.

Примечание: цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния.

Литература

1. Лукашев В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 256 с. : ил.
2. Oberste M.S., Maher K, Williams AJ, Dybdahl- Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses // J. Gen. Virol. – 2006. – Vol. 87, № 1. - P. 119–128.
3. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 8. – P. 2698–704.
4. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. - 1993. - Vol. 10. - P. 512–526.
5. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. // Molecular Biology and Evolution. - 2013. – Vol. 30. – P. 2725-2729.

Сведения об авторах

Сапега Елена Юрьевна – к.м.н., руководитель Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, E-mail: evi.khv@mail.ru

Бутакова Людмила Васильевна – младший научный сотрудник Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, E-mail: evi.khv@mail.ru

Котова Валерия Олеговна – и.о. зав. лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, E-mail: dvaids@mail.ru