

УДК: 578.5:578.835.1 Enterovirus – 036/22 (571.6)"2014/2015"

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2014-2015 ГОДАХ

Е.Ю. Сапега, Л.В. Бутакова, В.О. Котова, Е.Н. Амяга, О.Е. Троценко
*ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора,
г. Хабаровск, Россия*

Энтеровирусная инфекция остается актуальной проблемой для населения всего мира, при этом заболеваемость в странах Азиатско-Тихоокеанского региона выше, чем в Европейских странах и странах Америки. На территории Дальневосточного федерального округа Российской Федерации ежегодно регистрируются подъемы заболеваемости. При исследовании проб клинического материала молекулярно-биологическим методом в период с 2014 по 2015 годы получено и идентифицировано 512 нуклеотидных последовательностей. Наиболее распространенными были серотипы Коксаки А-6 и ECHO-30. Все штаммы Коксаки А-6, согласно классификации Y.Q. He (2013 г.), отнесены к генотипу D и в пределах данного генотипа разделены на три субтипа (D1, D2 и D3). Типированные нами штаммы энтеровируса ECHO-30 принадлежат к генотипу H, по классификации J.Bailly (2009 г.).

Ключевые слова Энтеровирусная инфекция, нуклеотидные последовательности, серотип, энтеровирус Коксаки А-6, энтеровирус ECHO-30, генотип.

MOLECULAR GENETIC PECULIARITIES OF ENTEROVIRUS CIRCULATION IN THE FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION IN 2014-2015

E.Yu. Sapega, L.V. Butakova, V.O. Kotova, E.N. Amyaga, O.E. Trotsenko,
*Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service
for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor),
Khabarovsk, Russian Federation*

Enteroviral infection remains to be a current issue for world population, however morbidity in the countries of Asia-Pacific Region is always greater than in European countries and America.

On the territory of the Far Eastern federal district of the Russian Federation registered morbidity rates increase every year. During 2014-2015 were received and identified 512 nucleic acid sequences using molecular genetic diagnosis.

Most common serotypes were Coxsackievirus A-6 and ECHO 30. All strains of Coxsackievirus A-6 according to classification of YA-Qung He (2013) are classified as genotype D and within the genotype are divided on three subtypes (D1, D2 and D3).

Typing of enterovirus ECHO 30 revealed that the strains belong to genotype H according to classification of J.Bailly (2009).

Key words: enteroviral infection, nucleic acid sequence, serotype, enterovirus Coxsackievirus A 6, enterovirus ECHO 30, genotype.

Введение

Энтеровирусная инфекция (ЭВИ) остается актуальной проблемой для населения всего мира. Согласно современной классификации энтеровирусы подразделяют на 4 группы (А, В, С, D), которые включают более 100 типов [3]. Наиболее значимыми в развитии ЭВИ являются энтеровирусы групп А и В.

В странах Азиатско-Тихоокеанского региона (АТР) заболеваемость ЭВИ стабильно выше, чем на территориях Европейского и Северо-Американского континентов. Приграничное расположение отдельных субъектов Дальневосточного федерального округа Российской Федерации (ДФО РФ) со странами АТР, тесные социально-экономические и миграционные связи способствуют трансграничной циркуляции энтеровирусов. Поэтому постоянный мониторинг и изучение молекулярно-биологических особенностей энтеровирусов являются необходимыми составляющими эпидемиологического надзора за ЭВИ в ДФО РФ.

В последнее время энтеровирус Коксаки А-6 (СА6) все чаще выявляется при вспышечной и спорадической заболеваемости как на территории России, так и в зарубежных странах [9, 12, 17]. Вспышки, вызванные этим штаммом энтеровируса, регистрировались в таких странах, как Китай, Япония, Таиланд, Италия, Франция, Куба. Инфекционный процесс, вызванный данным серотипом, чаще проявляется в виде герпангины, экзантемы и ящуроподобного синдрома (HFMD), при этом возможны появление атипичной сыпи (вплоть до буллезной) и тяжелое течение заболевания [9, 20]. Иностранцами авторами описано осложнение, развивающееся через 2 месяца после перенесенной СА6 – инфекции, в виде ониходистрофии с полным отслоением ногтевой пластины – онихомадезис [18].

Энтеровирус ЕСНО-30 является одним из основных возбудителей серозно-вирусного менингита, который в последнее десятилетие наблюдается во всем мире, включая США, Францию, Канаду, Италию, Германию, Англию, Японию, Корею, Вьетнам, Тайвань и материковый Китай [11, 13, 19]. В провинциях Китая зарегистрировано несколько эпидемий, вызванных энтеровирусом ЕСНО-30 [10, 23]. В Российской Федерации вспышки серозно-вирусного менингита, обусловленные энтеровирусом ЕСНО-30, были зарегистрированы в Нижнем Новгороде (2007 г.), в Хабаровском крае (2006 и 2011 гг.), в Приморском крае и Архангельской области (2008 г.), в Магаданской (2013 г.) и Новгородской областях (2008-2009 гг.) [1, 2]. Кроме того, в единичных случаях энтеровирус ЕСНО-30 регулярно выявлялся среди больных ЭВИ в Хабаровском крае в 2012 и 2014 годах, в Приморском крае – в 2010, 2011 и 2013 годах, в ЕАО – в 2011, 2012, 2013 и 2015 годах, в Республике Саха (Якутия) – в 2014 году. Однако явных вспышек энтеровирусного менингита в эти годы не наблюдалось.

Цель исследования: изучить молекулярно-биологические особенности энтеровирусов, циркулировавших на территории ДФО в 2014-2015 годах.

Материалы и методы:

В лаборатории Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ (ДВРНМ Центр), расположенного на базе ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, в период с 2014 по 2015 годы исследовано 1280 проб клинического материала и из объектов окружающей среды, поступавших из 7 субъектов ДФО РФ (Хабаровский, Приморский и Камчатский края, Республика Саха (Якутия), ЕАО, Амурская и Сахалинская области). Получено и изучено 512 нуклеотидных последовательностей.

РНК энтеровирусов выявляли методом ОТ-ПЦР с использованием тест-системы «Ампли-Сенс® Enterovirus-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Для амплификации участка VP1 генома применяли двухраундовое термоциклирование со следующими парами праймеров: 222 и 224 для первого раунда, AN88 и AN89 – для второго раунда (таблица 1) [15]. Продукты ПЦР определяли методом электрофореза в агарозном геле по стандартной методике согласно инструкции производителя набора. Для элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор производства ООО «БиоСилика» (Новосибирск).

Молекулярно-биологический анализ проводили путем секвенирования по методу Сэнгера с парой праймеров AN232 и AN233. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли по базе GenBank с помощью программы Blast. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе BioEdit. Из более чем 450 нуклеотидных последовательностей (н.п.) участка VP1 СА-6 и 2000 н.п. участка VP1 ЕСНО-30, имеющих в GenBank, были выбраны все последовательности, отличающиеся друг от друга на 1-3% (367 н.п. СА6 и 275 н.п. ЕСНО-30).

Таблица 1.

Праймеры для амплификации области VP1 генома ЭВ

№	Название	Последовательность праймера (5'-3')	Источник
1.	224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	W.A. Nix et.al., 2006
2.	222	CICCGIGGIGGIAYRWACAT	
3.	AN 89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	
4.	AN 88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	
5.	AN 232	CCAGCACTGACAGCA	
6.	AN233	TACTGGACCACCTGG	

Филогенетический анализ осуществлен с использованием байесовского алгоритма правдоподобия, реализованного в программе Beast версии 1.7.5 [8]. Использована модель замещения нуклеотидов SRD06, которая была оптимизирована для кодирующих последовательностей. Также применён метод непринужденной экспоненциальной настройки часов. Построение деревьев осуществлялось с помощью программы TreeAnnotator версии 1.4.8 и визуализировалось в программе Figtree версии 1.3.1 [14].

Результаты и обсуждение

На территории Дальневосточного Федерального округа Российской Федерации (ДФО РФ) ежегодно регистрируются летне-осенние подъемы заболеваемости ЭВИ, показатели которой превышают общероссийские приблизительно в 4,8 раза. Наибольшее число заболевших наблюдается в Хабаровском крае, Еврейской автономной и Сахалинской областях.

При молекулярно-биологическом исследовании проб клинического материала было получено 512 нуклеотидных последовательностей (н.п.) энтеровирусов, из них в 2014 году – 213 последовательностей, а в 2015 году – 299 н.п. (таблица 2).

В период с 2014 по 2015 годы наиболее распространенными серотипами были СА6 и ЕСНО-30. При этом в 2015 году данных серотипов типировано в 2,3 раза больше по сравнению с 2014 годом.

Таблица 2.

Вирусы, идентифицированные у пациентов с ЭВИ и в объектах окружающей среды молекулярно-биологическим методом в 2014-2015 гг.

Серотип вируса		Территории ДФО							ВСЕГО
		Хабаровский край	Приморский край	Сахалинская область	ЕАО	Республика Саха (Якутия)	Амурская область	Камчатский край	
Coxsackievirus B	2	8	1		2		4		15
	3	4	5	3				1	13
	4	4			2	6	3		15
	5	18			4		1		23
Coxsackievirus A	1	1		2	4		1		8
	2	12		1	3	5			21
	4	10		5	2				17
	5	10		1	27	3			41
	6	78		8	41	19	6		152
	8	3							3
	9	17			3	1			21
	10	4			2	4		3	13
	14	1					1		2
	16			3		3	1		7
	19	5					1		6
	24	1			4				5
Е С Н О	1	1							1
	3	1							1
	6	4							4
	9				7				7
	11			1	7				8
	14					1			1
	18	25			6				31
	20	3	1						4
	21	4							4
	25	2		1	2				5
	30	55	3		4	16	1		79
э/в	71	5							5
Итого		276	10	25	120	58	19	4	512

В ДФО энтеровирус СА6 выделялся с 2009 года, количество выявленных штаммов за последние три года возросло. Циркуляция СА6 наблюдается практически во всех субъектах ДФО, кроме Магаданской области, ЧАО и Приморского края. Вспышки энтеровирусной инфекции, обусловленные, в

основном, энтеровирусом СА6, регистрировались в Амурской области и в Хабаровском крае. Наибольшее количество типированных нами штаммов СА6 выделено из клинического материала, поступившего из Хабаровского края, ЕАО и Республики Саха (Якутия).

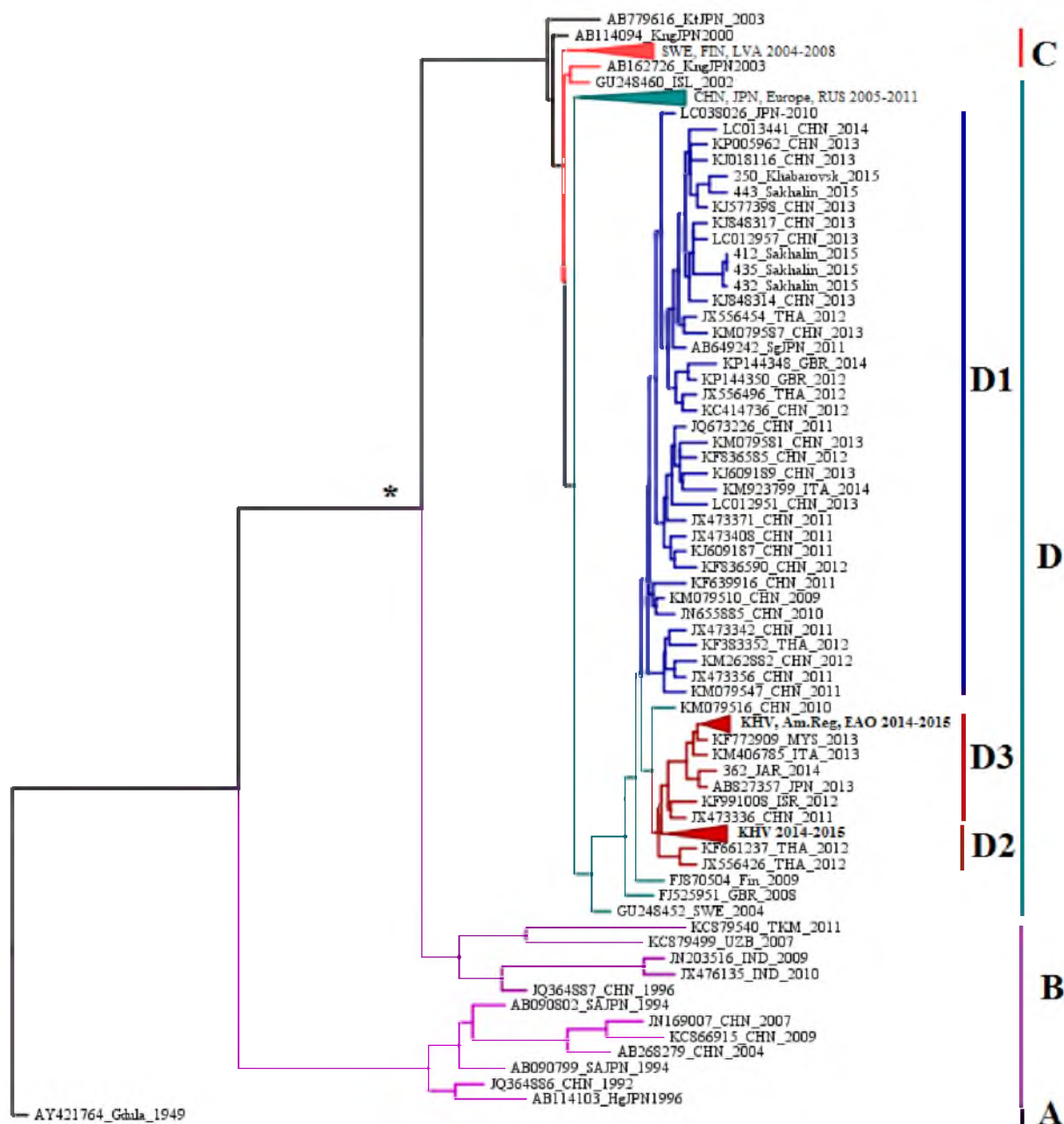


Рис. 1. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов Коксаки А-6 с подразделением на генотипы

Официальной классификации внутритиповых генотипов энтеровируса СА6 в настоящее время не существует. Ya-Qing He et al. в своей работе (2013 г.) для выделения генотипов использовали различие нуклеотидных последовательностей участка генома VP1 $\geq 15\%$ [22]. Согласно данному подходу, штаммы СА6 были разделены на шесть генотипов (А, В, С, D, Е и F).

Используя тот же принцип, мы отнесли все штаммы СА6, типированные в 2014 и 2015 годах, к генотипу D (рис.1). При этом дальневосточные штаммы в пределах данного генотипа разделились на три субтипа (D1, D2 и D3). Уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей колебался от 6,1 до 8,0%. Попарные расстояния в пределах генотипа D составили $\leq 8\%$. Во всех случаях дальневосточные штаммы СА6 группировались со штаммами, выделенными в странах АТР и Европы в 2009-2014 годах, что указывает на их сходство.

Наряду с азиатскими и европейскими штаммами, субтип D1 представлен сахалинскими и одним хабаровским штаммом (№ 250) 2015 года. При этом дальневосточные штаммы оказались на 97% идентичными друг другу и вместе с китайскими штаммами 2013 года имеют единого предшественника.

Субтип D2 сформировали два хабаровских штамма, типированные в 2014-2015 годах, и штаммы, выделенные в Японии, Китае и Таиланде в 2011-2012 годах. Расхождение признаков у родственных штаммов СА6 субтипов D2 и D3 в процессе их эволюции произошло примерно 6 лет назад (2009-2010 гг.).

В состав субтипа D3 вошли штаммы, выделенные нами из биоматериала, поступившего из Хабаровского края, Амурской области, Еврейской автономной области в 2014-2015 годах. Они составили единую группу, имеющую высокую степень гомологии (97,0-96,0%). Наиболее сходными с ними оказались штаммы, выделенные в Малайзии и Италии в 2013 году, при этом расхождение признаков внутри субтипа D3 произошло примерно 3-4 года назад (2011-2012 гг.).

Таким образом, на территории ДФО РФ выявлена циркуляция трех субтипов генотипа D энтеровируса СА6. Наиболее сходными с ними были штаммы, выявленные в странах АТР.

В 2015 году в г. Комсомольске-на-Амуре Хабаровского края зарегистрирован значительный подъем заболеваемости СВМ, обусловленный энтеровирусом ECHO-30. В двух других территориях ДФО (Приморский край и ЕАО) также наблюдалась циркуляция штамма ECHO-30.

Все штаммы ECHO-30, типированные в ДФО в 2014 и 2015 годах, принадлежали к генотипу H по классификации J. Bailly [4]. При этом комсомольские штаммы энтеровируса ECHO30 2015 года оказались на 100% идентичны хабаровским штаммам 2014 года и штаммам, выделенным из клинических проб от больных ЕАО в 2015 году, и на 98% - хабаровскому штамму 2012 года (KP090780_RUS_2012), (рис.2).

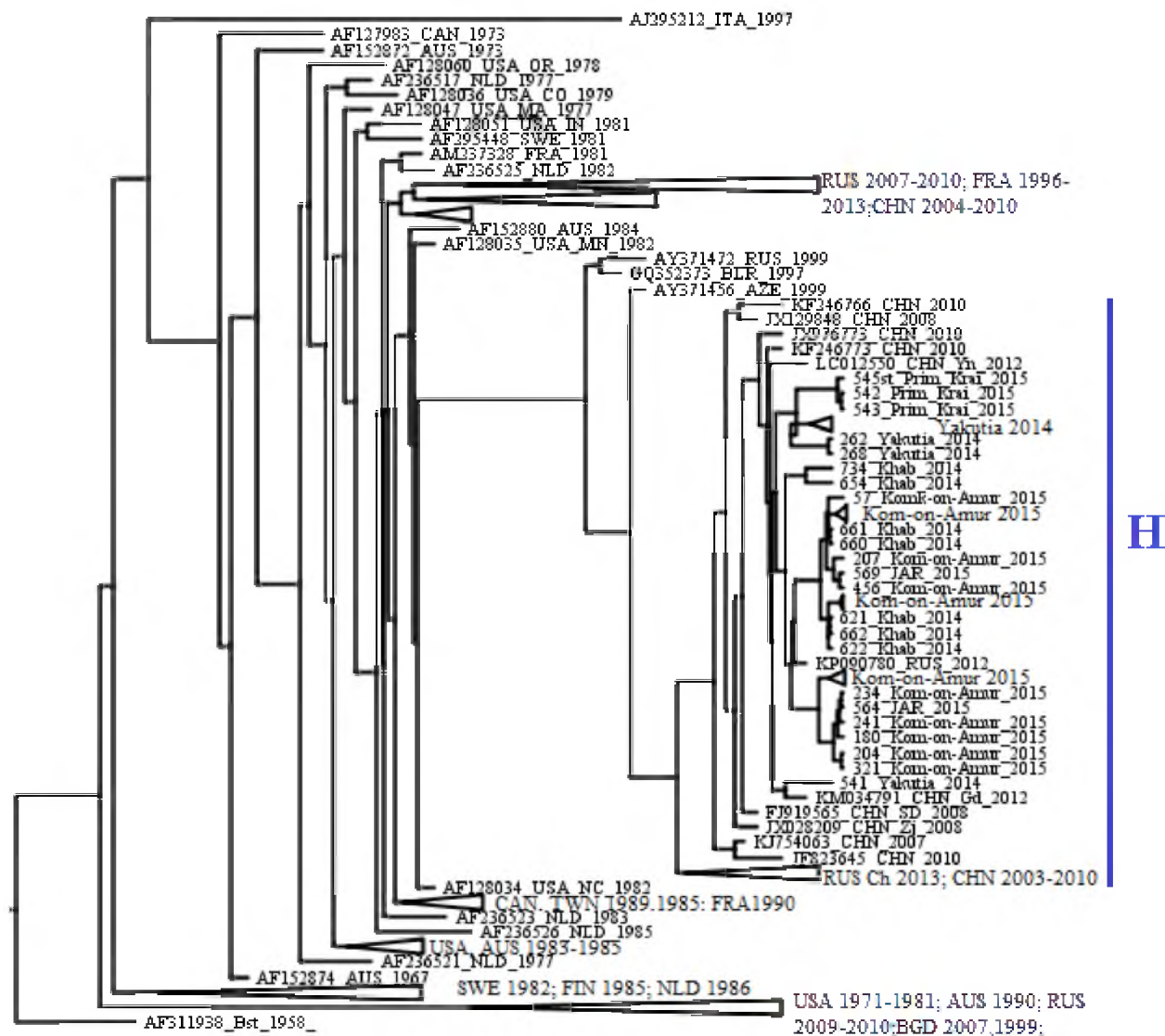


Рис. 2. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов ECHO-30

Штаммы ЕСНО-30, типированные в Приморском крае в 2015 году, отличались от хабаровских, комсомольских и якутских штаммов на 2,4-3,3%. На филограмме указанные штаммы ЕСНО-30 совместно с вирусами, циркулировавшими в Китае в период с 2010 по 2012 годы, составили единую группу, что свидетельствует об их эпидемиологической связи. Кроме того установлено, что вирус ЕСНО-30, выделенный на указанных территориях ДФО, имеет общего предка со штаммами, циркулировавшими также и на территории западной части России в 2013 году.

Таким образом, энтеровирус ЕСНО-30 генотипа Н широко циркулирует на территории ДФО с 2012 года и, по всей вероятности, был занесен из Юго-Восточной Азии.

Выводы:

1. На трех территориях ДФО РФ (Хабаровский край, Еврейская автономная и Сахалинская области) регистрируется максимальное число заболевших ЭВИ, при этом показатели заболеваемости превышают общероссийские.
2. В период с 2014 по 2015 годы наиболее распространенными серотипами были СА6 и ЕСНО-30, количество которых возросло в 2015 году.
3. Выделенные нами энтеровирусы СА6 по классификации Y.Q. He (2013 г.) отнесены к генотипу D и в пределах данного генотипа разделены на три субтипа (D1, D2 и D3). Наиболее сходными с ними оказались штаммы, выявленные в странах АТР.
4. Все штаммы ЕСНО-30, типированные в ДФО в 2014 и 2015 годах, принадлежат к генотипу Н по классификации J.Bailly (2009 г.). Широкая циркуляция энтеровируса ЕСНО-30 генотипа Н на территории ДФО РФ, наблюдаемая с 2012 года по настоящее время, по всей вероятности, обусловлена заносом из стран Юго-Восточной Азии.

Литература:

1. Онищенко Г.Г., Осипова Т.В., Грачева Е.В. и др. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Нижнем Новгороде в 2007 году: молекулярно-эпидемиологические аспекты// Журнал микробиологии – 2009. – №2. – С.24-30.
2. Шишко Л.А., Романенкова Н. И., Бичурина М. А. и др. Этиология сезонных подъемов заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Архангельской области // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, №1. – С. 65-72.
3. Энтеровирусы [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>
4. Bailly J.L., Mirand A., Henquell C. at al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene.// Infect. Genet. Evol. – 2009. – Vol. 9. – № 4. – P. 699-708.
5. Batts A.F., Jalalat S.Z., Hunter-Ellul L. at al. Exacerbation of bullous pemphigoid after hand, foot, and mouth disease treated with rituximab.// JAAD Case Rep. – 2016. – Vol. 8. – № 2(1). – P. 7-9.
6. Buttery V.W., Kenyon C., Grunewald S. at al. Atypical Presentations of Hand, Foot, and Mouth Disease caused by Coxsackievirus A6-Minnesota, 2014.// MMWR. – 2015. – Vol. 31. – № 64(29). – P. 805.
7. Chatproedprai S., Tempark T., Wanlapakorn N., at al. Unusual skin manifestation of hand, foot and mouth disease associated with coxsackievirus A6: cases report.// Springerplus. – 2015. – Vol. 17. – № 4. – P. 362.
8. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // BMC Evol Biol – 2007. – Vol. 7. – P. 214.
9. Henry M., Feder Jr., Nicholas Bennett, MBB Chir, John F. Modli. Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackievirus A6. // The Lancet Infectious Disease. – Vol. 14. – №1. – P. 83-86
10. Hong Xiao, Keyong Huang, Ling Li et al. Complete genome sequence analysis of human echovirus 30 isolated during a large outbreak in Guangdong Province of China, in 2012. //Arch Virol – 2014. – Vol. 159. – P. 379-383.
11. Hye-Jin Kim, Byounghak Kang, Seoyeon Hwang et al. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. // Virology Journal – 2012. – Vol. 9. – P. 38.
12. Kobayashi M., Makino T., Hanaoka N. at al. Clinical Manifestations of Coxsackievirus A6 Infection Associated with a Major Outbreak of Hand, Foot, and Mouth Disease in Japan. // Jpn. J. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 66. – P. 260-261.
13. Leveque N., Jacques J., Renois F. at al. Phylogenetic analysis of Echovirus 30 isolated during the 2005 outbreak in France reveals existence of multiple lineages and suggests frequent recombination events.// J. Clin. Virol. – 2010. – Vol. 48. – № 2. – P. 137-141.
14. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

15. Nix W.A, Oberste M.S, Pallansch M.A. 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.
16. Osterback R., Koskinen S., Merilahti P. et al. Genome Sequence of Coxsackievirus A6, Isolated during a Hand-Foot-and-Mouth Disease Outbreak in Finland in 2008. // Genome Announc. – 2014. – № 16. – 2(5).
17. Osterback R., Vuorinen T., Mervi Linna et al. Coxsackievirus A6 and Hand, Foot, and Mouth Disease, Finland. // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 1485–1488.
18. Renert-Yuval Y., Marva E., Weil M. et al. Coxsackievirus A6 Polymorphic Exanthem in Israeli Children. // Acta. Derm. Venereol. – 2016. – Vol. 12. – № 96 (4). – P. 546-9.
19. Roth B, Enders M, Arents A. et al. Epidemiologic aspects and laboratory features of enterovirus infections in Western Germany, 2000-2005. // J. Med. Virol. – 2007. – Vol. 79. – P. 956–962.
20. Sinclair C., Gaunt E., Simmonds P. et al. Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus a6 infection, edinburgh, united kingdom, january to february 2014. // Eurosurveillance. – 2014. – Vol. 19. – № 12. – P. 27.
21. Vuorinen T., Osterback R., Kuisma J. et al. Epididymitis caused by coxsackievirus A6 in association with hand, foot, and mouth disease. // J. Clin. Microbiol. – 2014. Vol. 52. – № 12. – P. 4412-3.
22. Ya Nan Zhao, David S. Perlin, Steven Park et al. FDJS03 Isolates Causing an Outbreak of Aseptic Meningitis in China That Evolved from a Distinct Echovirus 30 Lineage Imported from Countries of the Commonwealth of Independent States. // Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44. – № 11. – P. 4142–4148.
23. Ya-Qing He, Long Chen, Wen-Bo Xu et al. Emergence, Circulation, and Spatiotemporal Phylogenetic Analysis of Coxsackievirus A6- and Coxsackievirus A10-Associated Hand, Foot, and Mouth Disease Infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China. // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – № 11. – P. 3560-3566.

Сведения об авторах

Сапега Елена Юрьевна – кандидат медицинских наук, руководитель Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций. E-mail: adm@hniiem.ru