

На правах рукописи

Устюжанин Александр Владимирович

Молекулярно-генетический мониторинг носительства неполиомиелитных
энтеровирусов в анализе и прогнозе уровня заболеваемости энтеровирусным
менингитом в условиях мегаполиса

03.02.02 - Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Уральский Государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Сергеев Александр Григорьевич**

Официальные оппоненты:

Ведущая организация

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы энтеровирусных инфекций (ЭВИ) определяется многообразием и широким географическим распространением этиологических агентов, периодическим возникновением эпидемических подъемов и вспышечной заболеваемости, полиорганотропностью и высокой контагиозностью возбудителей, непредсказуемой изменчивостью степени их вирулентности, высоким процентом бессимптомных и стертых форм инфекции у вирусовыделителей, а также отсутствием средств специфической профилактики.

В Российской Федерации надзор за ЭВИ рассматривается в качестве одной из составляющих частей надзора за полиомиелитом в постсертификационный период в рамках реализации Национального плана по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации [Программа "Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции на 2015-2017 гг."].

Степень разработанности темы исследования

Система Государственного санитарно-эпидемиологического надзора за ЭВИ в России 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 [Устюжанин А. В. и др., 2013]. 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 [В.В. Пархоменко, <http://www.cgekuban.ru/publication/epid/enterovir.php>]. Кроме этого, существенным недостатком использования клеточных культур для выделения НПЭВ является наличие большой группы некультивируемых и плохо культивируемых серотипов, которые остаются за пределами поля зрения исследователей. Применение молекулярно-генетического метода индикации НПЭВ (ПЦР) позволяет значительно повысить процент обнаружения положительных проб, однако попытки дальнейшего генотипирования методом секвенирования в большом проценте случаев не дают положительного результата в связи с тем, что в пробах присутствует более одного серотипа НПЭВ, а в случае получения положительного результата нельзя исключить присутствие в пробе других серотипов в гораздо меньших концентрациях [Лесников Н. Т. и др., 2012].

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

- как связан рост заболеваемости ЭВИ с частотой выявления вирусоносителей НПЭВ среди населения крупного промышленного центра;
- каково соотношение циркулирующих серотипов НПЭВ с частотой их встречаемости в качестве этиологических агентов ЭВИ;
- по каким критериям можно оценить эпидемический потенциал штаммов НПЭВ, выявленных у вирусоносителей, и оценить риск развития неблагоприятной эпидемиологической ситуации.

Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что для ответа на поставленные вопросы необходимо получение дополнительной информации об интенсивности циркуляции и спектре серотипов НПЭВ, выявленных у вирусоносителей.

Целью настоящего исследования явилась оценка эпидемического потенциала этиологических агентов ЭВМ на основе результатов молекулярно-генетического мониторинга носительства НПЭВ среди населения крупного промышленного центра (г. Екатеринбург).

Задачи исследования:

1. Определить возрастную группу населения с наиболее высокой частотой инфицирования НПЭВ (индикаторная группа).
2. Определить характер временных связей между сезонными изменениями частоты вирусоносительства у практически здоровых лиц и заболеваемостью ЭВМ.
3. Провести молекулярно-генетическое типирование и сравнительный анализ спектра и выявляемости отдельных серотипов НПЭВ, обнаруженных в ликворе больных ЭВМ и выделенных от лиц с бессимптомной формой инфекции, за период наблюдения (2010-2014 гг.).
4. Провести сравнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей эпидемически значимых штаммов НПЭВ, выделенных в период с 2005 г. по 2014г. от больных ЭВМ и практически здоровых лиц, проживающих на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области.

5. На основании сравнительного анализа частоты выявления доминирующих этиологических агентов ЭВМ у больных и вирусоносителей оценить эпидемический потенциал циркулирующих в популяции серотипов НПЭВ.

6. Оценить возможность использования показателей вирулентности и филогенетических особенностей штаммов НПЭВ, доминирующих в начале текущего эпидсезона в качестве этиологических агентов ЭВМ, для составления краткосрочного прогноза развития эпидемического процесса на период до конца текущего эпидсезона.

Научная новизна:

1. Впервые показано, что период времени между пиковым значением выявляемости НПЭВ среди здорового населения и пиком показателя заболеваемости ЭВМ может варьировать в широких пределах (от одного до четырех месяцев).

2. Впервые показано, что процент вирусоносителей, выявленных во время сезонного подъема заболеваемости ЭВМ, может быть высоким, по отношению к среднемесячным показателям, при низком уровне заболеваемости ЭВМ и наоборот, относительно низким при высокой заболеваемости.

3. Впервые показано, что спектр серотипов НПЭВ, выявляемых у вирусоносителей, представлен, в основном, слабовирулентными плохо культивируемыми штаммами вирусов Коксаки группы А, принадлежащих видам А и С энтеровирусов человека.

4. Впервые определен спектр геновариантов серотипов НПЭВ, эндемичных для территории г. Екатеринбурга и Свердловской области.

5. Впервые разработан комплекс критериев, позволяющих оценить эпидемический потенциал выявленных штаммов НПЭВ, по их вирулентности (на основе учета соотношения процента выявления определенного серотипа в ликворе больных ЭВМ и частоты его обнаружения у лиц с бессимптомной энтеровирусной инфекцией) и эндемичности.

6. Впервые предложена методика краткосрочного прогноза заболеваемости ЭВМ на период до конца текущего эпидсезона с учетом результатов мониторинга выявляемости НПЭВ в начале эпидсезона.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Настоящая работа является первым комплексным исследованием, позволившим получить данные о типовом составе и эпидемическом потенциале эндемичных и «заносных» штаммов НПЭВ, циркулирующих на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области.

Полученные результаты позволяют в дальнейшем своевременно устанавливать включение в циркуляцию вирулентных штаммов НПЭВ и прогнозировать неблагоприятное развитие эпидемиологической ситуации по заболеваемости ЭВМ на территории мегаполиса.

В международном банке генетической информации GenBank NCBI задепонировано 162 нуклеотидные последовательности (96 - VP2 и 66 - VP1)

штаммов НПЭВ, выявленных среди населения на территории УФО в период с 2005 г. по 2014 г.

Методология и методы исследования

В ходе проведения научной исследовательской работы применялись стандартные молекулярно-генетические методы исследования: полимеразная цепная реакция, секвенирование, филогенетический анализ. Индикацию неполиомиелитных энтеровирусов в исследуемом материале проводили с помощью полимеразной цепной реакции с предварительной обратной транскрипцией. Генотипирование обнаруженных энтеровирусов осуществляли методом прямого секвенирования последовательностей участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 и дальнейшего их сравнения с помощью программы BLAST с последовательностями, депонированными в международном банке генетической информации NCBI GenBank.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее информативной возрастной группой для проведения мониторинга циркуляции НПЭВ среди практически здорового населения с целью оценки эпидемического потенциала штаммов, являются дети в возрасте 3-6 лет.

2. В спектре серотипов НПЭВ, выявленных среди населения, преобладают слабовирулентные плохо культивируемые штаммы вирусов Коксаки группы А (виды А и С), в то время как энтеровирусы, обнаруженные в ликворе больных ЭВМ, относятся к виду В.

3. Соотношение частоты выявления определенного серотипа НПЭВ в фекальном материале вирусоносителей и в ликворе больных ЭВМ можно использовать в качестве прогностического показателя вирулентности при оценке эпидемического потенциала обнаруженных штаммов.

4. Молекулярно-генетический мониторинг носительства НПЭВ среди практически здорового населения позволяет своевременно оценивать риск неблагоприятного развития эпидемиологической ситуации по заболеваемости ЭВМ на основе комплексного анализа вирулентности и эндемичности выявленных штаммов.

Личный вклад автора в проведенное исследование состоит в самостоятельном проведении лабораторных исследований (выделение, амплификация нуклеиновых кислот, типирование серотипов НПЭВ, филогенетический анализ), статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь была оказана сотрудником кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России: Резайкиным А. В.- при прямом секвенировании, типировании и филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей выделенных штаммов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследований, проведенных в ходе выполнения работы, подтверждена статистическим методом анализа данных.

Результаты исследований внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО "Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения РФ.

Основные результаты работы представлены и обсуждены на 61-й, 64-й, 65-й, 66-й, 67-й, 68-й, 69-й и 70-й межвузовских научно-практических конференциях молодых ученых и студентов с международным участием "Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения" (г. Екатеринбург, 2006, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 и 2015 гг.); Региональном совещании «Совершенствование эпидемиологического надзора за полиомиелитом и энтеровирусной (неполио) инфекцией», г. Екатеринбург, 2011г., VI региональной научно-практической конференции «Перспективы использования в медицинской практике новых иммунобиологических препаратов, полученных на основе клеточных культур» г. Екатеринбург, 2012г., Втором конгрессе педиатров Урала с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», г. Екатеринбург, 2012г., X съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения РФ» Москва, 2012г., Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Микробиология в современной медицине», Казань, 2013г., VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» г. Москва, Международной научно-практической конференции Перспективы сотрудничества государств – членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней, г. Сочи 2015г., IX окружной научно-практической конференции «Актуальные аспекты вирусных инфекций», г. Екатеринбург, 2015г., Всероссийской научно-практической конференции "Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями" г. Нижний Новгород, 25 мая 2016г., Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», 26-27 сентября 2016, г. Новосибирск.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, главы литературного обзора, описания использованных материалов и методов, 3-х глав собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 112 отечественных и 78 зарубежных источников, и приложения. Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста, иллюстрирована 21 таблицей и 14 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

На предмет обнаружения РНК НПЭВ было исследовано 2906 проб биологического материала (фекалии, ликвор, носоглоточный смыв), в том числе 515 образцов ликвора от больных ЭВИ, проживающих на территории г.

Екатеринбурга, городов Свердловской, Пермской, Тюменской, Курганской, Челябинской областей и 2391 проба фекалий, полученных от детей с бессимптомной формой инфекции из г. Екатеринбурга в возрасте до 17 лет.

Суммарную ДНК\РНК выделяли из 100 мкл исследуемого материала (экстракт фекалий, ликвор) методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью набора реагентов "РИБО-сорб" (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК "РЕВЕРТА-L" (ФГУН "ЦНИИ Эпидемиологии" Роспотребнадзора, Москва), содержащий ревертазу MMiv и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов, в соответствии с рекомендациями производителя.

Аmplификацию кДНК проводили с помощью набора реагентов "АмплиСенс Enterovirus-EPh" (ФГУН "ЦНИИ Эпидемиологии" Роспотребнадзора, Москва) в термоциклере Терцик ("ДНК-технология", Москва) по программе, рекомендованной изготовителем набора. Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Положительными считали образцы, содержащие специфическую светящуюся полосу на уровне 207 пар нуклеотидов.

Идентификацию обнаруженных энтеровирусов проводили по нуклеотидным последовательностям участков генома, кодирующих белки VP1 [Casas I., 2001], VP4 и VP2 [Arola A., 1996].

Секвенирование фрагментов ДНК проводили по методу Сенгера [Sanger F., 1977] по прямой и обратной последовательностям продуктов второго раунда ПЦР с праймерами 4F,5R и 2S,2A для последовательностей, кодирующих VP2 и VP1, соответственно, на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems, США), следуя рекомендациям производителя.

Выравнивание последовательностей нуклеотидов и аминокислот, филогенетический и молекулярно-эволюционный анализ, а также статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.1 [Tamura K., 2011].

Молекулярное типирование проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) методом сравнительного анализа полученных последовательностей с референтными последовательностями геномов энтеровирусов, выделенных ранее разными авторами на территории России и других стран, представленными в международной базе генетических данных GenBank.

Филограммы были построены по алгоритму «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining). Расчет эволюционных дистанций между последовательностями производили согласно двухпараметрической модели М.Кимуры (Kimura 2-parameter). Достоверность топологии филограм оценивали

методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик. Достоверными считали построения при индексе поддержки не менее 70%. 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 χ^2 .

Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости населения г. Екатеринбурга и Свердловской области ЭВМ в 2006-2014 гг.

Результаты исследования и обсуждение

Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у больных энтеровирусным менингитом и у детей с бессимптомной формой инфекции

Всего за период наблюдения исследован 421 образец ликвора от больных ЭВМ, в которых методом ОТ-ПЦР были обнаружены энтеровирусы, в том числе - 319 проб от детей в возрасте от 0,5 года до 17 лет, 102 пробы от детей были получены без данных о возрасте. По нуклеотидным последовательностям, кодирующим белки VP2- VP4 и VP1, удалось идентифицировать 366 штаммов НПЭВ (86,9% от количества штаммов, обнаруженных в ликворе больных ЭВМ). Спектр обнаруженных серотипов НПЭВ представлен в таблице 1.

Таблица 1

Спектр серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных в пробах ликвора больных энтеровирусным менингитом

Год	Кол-во проб	Количество идентифицированных штаммов		Спектр серотипов
		Абс.	%	
2008	45	32	71	CA9 E 5, 6, 7, 11, 17, 30
2009	18	16	88,8	E 9, 14, 30
2011	18	14	78	CA 9 E 6, 9, 17, 18
2012	177	162	91,5	CA 9 CB 1, 2, 3, 4, 5 E 5, 6, 7, 14, 18, 25, 30
2013	123	103	83,7	CA 9 CB 2, 3, 4, 5 E 6, 9, 11, 14, 18, 30
2014	40	39	97,5	CA 9 CB 4, 5 E 2, 6, 14, 18, 30, EV97
Всего	421	366	86,9	

Результаты генотипирования свидетельствуют о достаточно широком спектре энтеровирусов, выступающих в качестве этиологических агентов сезонных подъемов заболеваемости серозным менингитом в г. Екатеринбурге.

Всего за период наблюдения было идентифицировано 18 серотипов НПЭВ, относящихся к виду В. Наибольшее разнообразие серотипов выявлено в 2012 г. и 2013 г. (13 и 11 серотипов, соответственно). На протяжении периода наблюдения ежегодно обнаруживался вирус Коксаки А9. В течение четырех лет подряд вирусы ЕСНО6 и ЕСНО18. По три года подряд среди этиологических агентов ЭВМ фигурировали вирусы Коксаки В4, В5, ЕСНО14 и ЕСНО30.

Вирусы КоксакиА9 и ЕСНО 6, 18, 30 образуют группу возбудителей, вызывавших более 70% случаев ЭВМ в г.Екатеринбурге в период 6-летнего наблюдения.

С целью уточнения частоты вирусоносительства НПЭВ в разных возрастных группах детей и определения индикаторной группы для проведения молекулярно-генетического мониторинга, в летние месяцы 2010 и 2011 гг. была отобрана 631 проба фекалий от детей в возрасте от 1 месяца до 15 лет. Результаты индикации и генотипирования энтеровирусов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота выявления неполиомиелитных энтеровирусов у детей различных возрастных групп в летние месяцы 2010-2011гг.

Возрастная группа	Кол-во обследованных	Результаты типирования					
		Положительный результат ПЦР		НПЭВ		Не типированы	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
До 3-х лет	130	12	9,2	6	50	6	50
3-6 лет	393	46	11,7	11	23,9	35	76,1
7-17 лет	113	7	6,2	5	71,4	2	28,6
Всего	636	65	10,2	22	33,8	43	66,2

Как видно из представленных данных, наиболее часто энтеровирусы обнаруживались у детей в возрасте 3-6 лет (11,7%) и у детей в возрасте до 3-х лет – 9,2%. У детей более старшего возраста энтеровирусы обнаруживались в меньшем проценте случаев (6,2%).

Согласно полученным результатам, наиболее информативной для проведения молекулярно-генетического мониторинга интенсивности циркуляции НПЭВ среди населения является возрастная группа детей от 3 до 6 лет (индикаторная группа).

С 2010 по 2014 гг. методом ПЦР было исследовано 2114 образцов фекалий от детей индикаторной группы. РНК НПЭВ была обнаружена в 226 пробах, что составило 10,7%. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3.

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	А1, В1, Е25

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	

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.

Спектр серотипов НПЭВ и частота их обнаружения у детей индикаторной группы в период наблюдения представлены на рисунке 1.

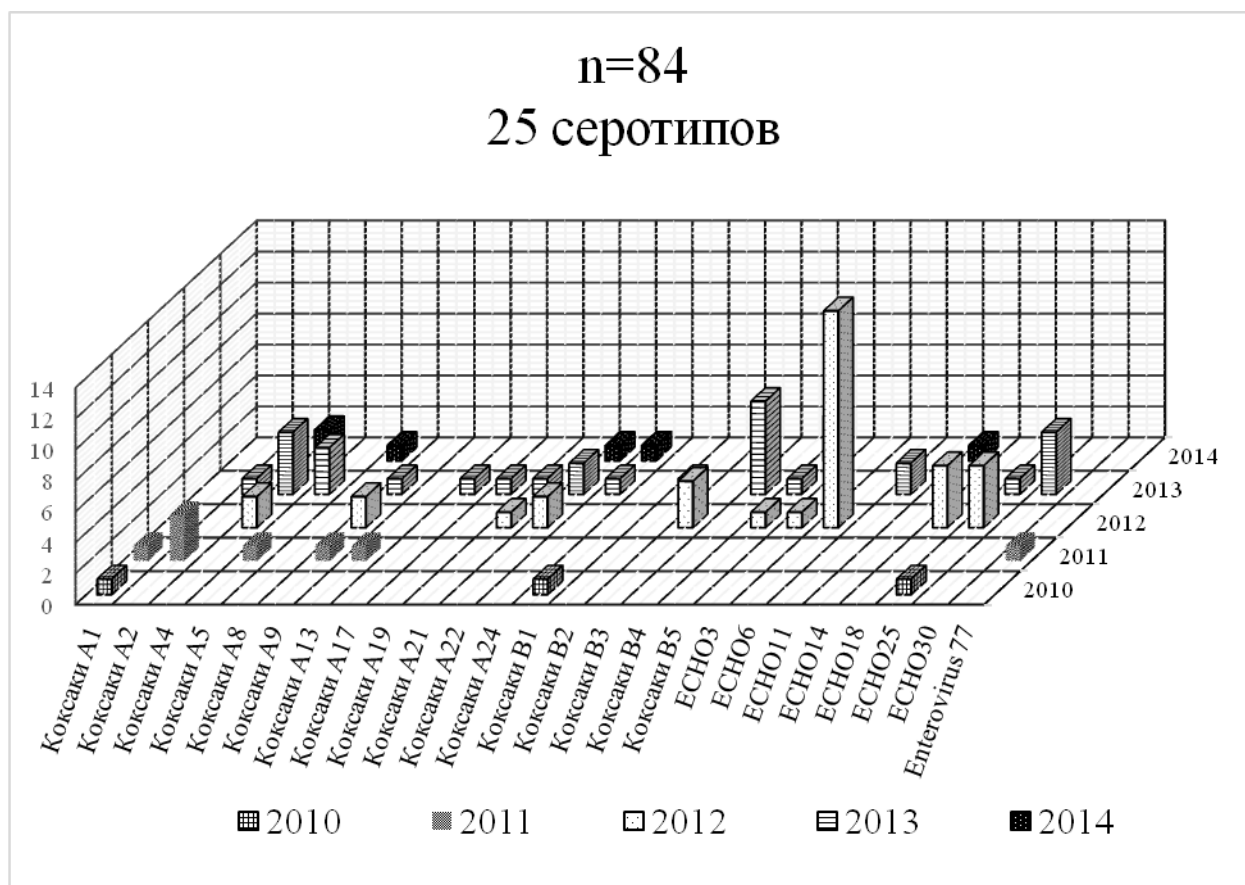


Рисунок 1. Спектр серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от детей с бессимптомной формой инфекции в возрасте 3-6 лет в период с 2010 по 2014 год.

В целом, можно отметить, что спектр серотипов НПЭВ, выявленных у вирусоносителей, отличается большим разнообразием по сравнению, обнаруженным в ликворе больных ЭВМ (18 и 25 серотипов, соответственно), в основном, за счет преобладания вирусов Коксаки группы А, представленных 12 серотипами. В качестве этиологического агента ЭВМ из этой группы вирусов фигурировал только Коксаки А9.

Видовой состав НПЭВ, обнаруженных у больных и клинически здоровых лиц, также имеет различия. Так, все серотипы НПЭВ, выявленные у больных ЭВМ, принадлежали виду В, в то время как у лиц с бессимптомной инфекцией обнаруживались энтеровирусы видов А, В и С.

Филогенетическая характеристика штаммов НПЭВ, циркулирующих в Свердловской области

Проведен анализ филогенетических связей штаммов двух доминирующих серотипов НПЭВ - ЕСНО6 и ЕСНО30, непрерывная циркуляция которых среди населения г. Екатеринбурга в течение многих лет периодически сопровождалась эпидемическими подъемами заболеваемости ЭВМ, и вируса Коксаки А9 - единственного представителя из группы Коксаки А, обнаруженного в качестве этиологического агента ЭВМ, доля которого в этиологической структуре возбудителей ежегодно была существенной.

Филогенетический анализ штаммов вируса ЕСНО30

При построении филограмм были проанализированы нуклеотидные последовательности 182 штаммов вируса ЕСНО30, выделенных в период с 2007 по 2014 годы из биологического материала (ликвор, фекалии, носоглоточные смывы) от 177 больных ЭВИ (преимущественно менингеальная форма), проживающих в г. Екатеринбурге, Свердловской, Челябинской, Тюменской и Курганской областях, от 3-х детей с бессимптомной формой инфекции из г. Екатеринбурга, а также из двух проб сточной воды г. Тюмени.

Все исследованные штаммы группировались с прототипным штаммом Bastianni, что подтверждает их принадлежность к серотипу ЕСНО30 (рис. 2). На филограмме можно выделить три кластера, объединяющих штаммы вируса ЕСНО30, относящиеся к геновариантам а, е и h (кластеры I, II и III, соответственно).

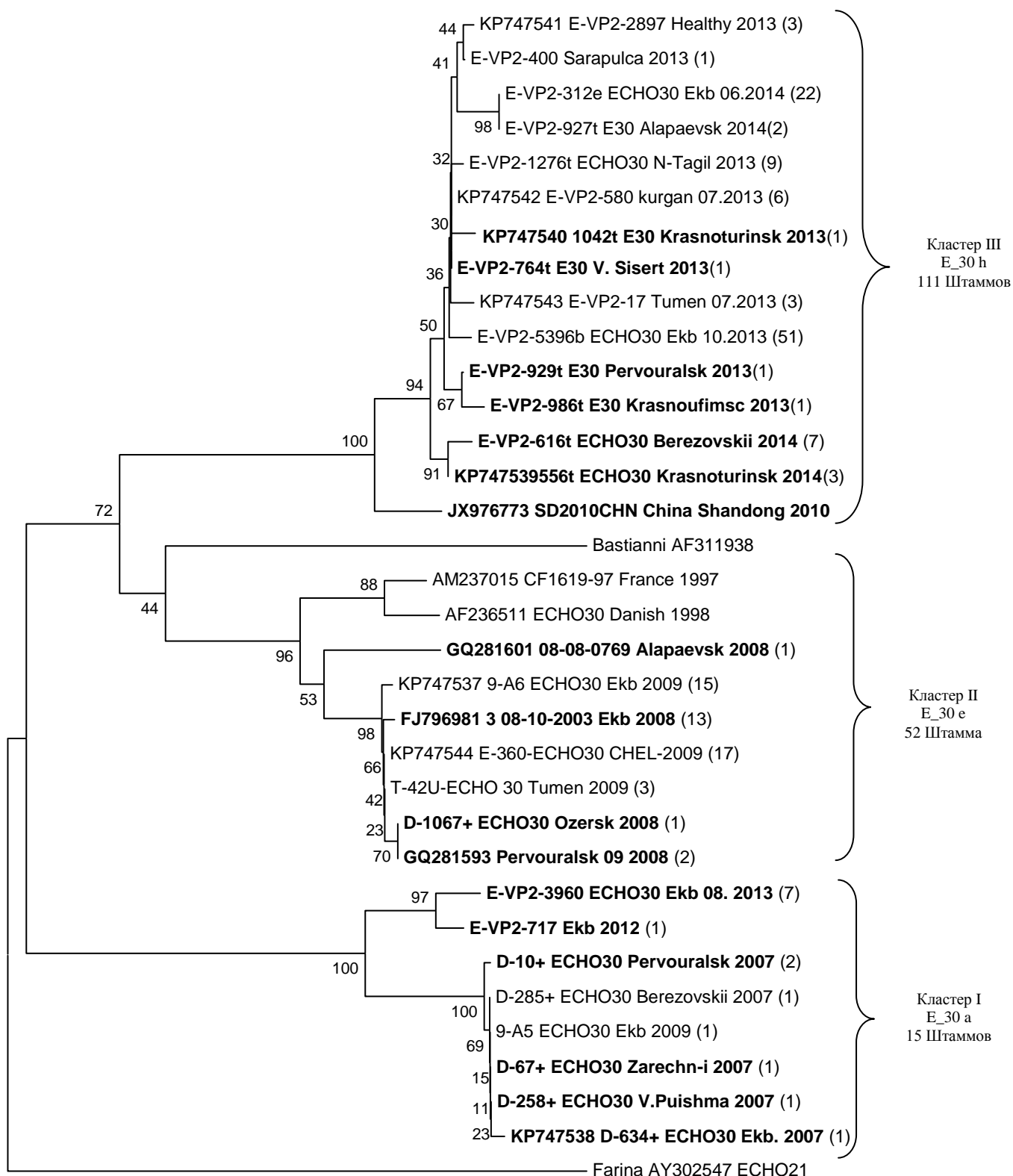


Рисунок 2. Филограмма штаммов вируса ЕСНО30, выявленных в г. Екатеринбургe и на территории Уральского Федерального округа в период с 2007 по 2014 год.

* - штаммы, выделенные полужирным шрифтом, секвенированы по обоим участкам генома.

В кластере I (геновариант ЕСНО30_a) сгруппированы штаммы, выделенные в г. Екатеринбурге и в населенных пунктах Свердловской области с 2007 г. по 2013 г. Штаммы, изолированные в 2007-2009 гг. и 2012-2013 гг. локализируются в двух субкластерах, и отличаются по нуклеотидным последовательностям области генома, кодирующей VP2-VP4 на 6,3% тогда как внутри каждого из субкластеров отличия составляют не более 0,9%.

В кластер II (геновариант ЕСНО30_e) вошли 56 из 57 штаммов, изолированных в 2008-2009 г.г., от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга, Свердловской, Челябинской и Тюменской областей, нуклеотидные последовательности которых совпадали не менее чем на 98,8%. Совпадение нуклеотидных последовательностей исследованных и референтных штаммов, выделенных в 1998 г. во Франции и Дании составило 92,2% и 93,4%, соответственно, что свидетельствует в пользу их европейского происхождения.

Штаммы, обнаруженные в 2013-2014 г.г. в ликворе 105 больных ЭВМ из г. Екатеринбурга, Свердловской, Челябинской, Тюменской, Курганской областей, и трех пробах сточной воды из г. Тюмени группировались в кластере III (геновариант ЕСНО30_h). Нуклеотидные последовательности штаммов, объединенных в данном кластере, отличались не более чем на 2%. Генетически близкий к указанным штаммам вирус был выделен от больных в Китае в 2010 г. (JX976773 SD2010CHN China Shandong 2010, идентичность 95,7%).

Особый интерес представляло выяснение генетических взаимоотношений между штаммами ЕСНО30, обнаруженными в указанный период времени в ликворе больных ЭВМ и фекальном материале клинически здоровых детей г. Екатеринбурга, учитывая тот факт, что данный серотип доминировал в этиологической структуре ЭВМ (58,5% от всех идентифицированных штаммов), но намного реже обнаруживался у здоровых вирусовыделителей (12% штаммов). Результаты филогенетического анализа показали, что все 3 штамма, изолированные от клинически здоровых детей в 2013 г. позиционируются в кластере III и по нуклеотидной последовательности, кодирующей белки VP2-VP4, практически идентичны штаммам, обнаруженным в ликворе больных ЭВМ.

Филогенетический анализ штаммов вируса ЕСНО6

За последние 10 лет на территории Свердловской области зарегистрировано две крупные эпидемические вспышки ЭВМ, вызванные вирусом ЕСНО6 (Североуральск, 2005 г., Алапаевск, 2006 г.). Особенно высокий уровень заболеваемости был отмечен в г. Алапаевске (203 на 100 тыс. населения). Вирус ЕСНО6 вновь был выделен от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга и Свердловской области в 2007 г. и в последующие годы его удельный вес среди возбудителей энтеровирусного менингита постепенно нарастал [Оленькова О. М., 2011]. В 2012 г. данный серотип стал доминирующим среди штаммов энтеровирусов, выделенных, как от больных ЭВМ (41,1%), так и от вирусоносителей г. Екатеринбурга (40%).

При построении филограм были проанализированы нуклеотидные последовательности 115 штаммов вируса ЕСНО6, выделенных в период с 2005 по 2014 годы из биологического материала (ликвор, фекалии) от 99 больных ЭВИ (преимущественно менингеальная форма), проживающих в г. Екатеринбурге, Свердловской, Челябинской областях и от 16 детей с бессимптомной формой инфекции из г. Екатеринбурга (рис. 3).

Все исследованные штаммы группировались с прототипным штаммом D`Amorì, что на молекулярном уровне подтверждает их принадлежность к серотипу ЕСНО6. 108 штаммов, из которых 92 были обнаружены в ликворе больных ЭВИ в 2005-2014 гг. и 16 штаммов, изолированных от клинически здоровых детей в 2012 г., образовывали большой кластер.

7 штаммов, выделенные от больных ЭВИ из г. Екатеринбурга и населенных пунктов Свердловской области в 2006-2008 гг. и в 2011-2012 гг. были четко обособлены от других и сгруппированы в малом кластере с референтными штаммами E6 AY896760 (Россия, 1999 г.) и E6 AV705309 (Япония, 2011 г.).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в г. Екатеринбурге и на территориях Свердловской, Челябинской, Курганской, Тюменской областей за период наблюдения происходила циркуляция, в основном, близкородственных эндемичных штаммов вируса ЕСНО6, вызвавших в 2005 и 2006 гг. эпидемические вспышки с высоким уровнем заболеваемости ЭВИ в г. Североуральске и г. Алапаевске, а в последующие годы идентифицированных в качестве этиологических агентов спорадических случаев ЭВИ. Одновременно наблюдалась менее интенсивная коциркуляция штаммов вируса ЕСНО6 иного происхождения.

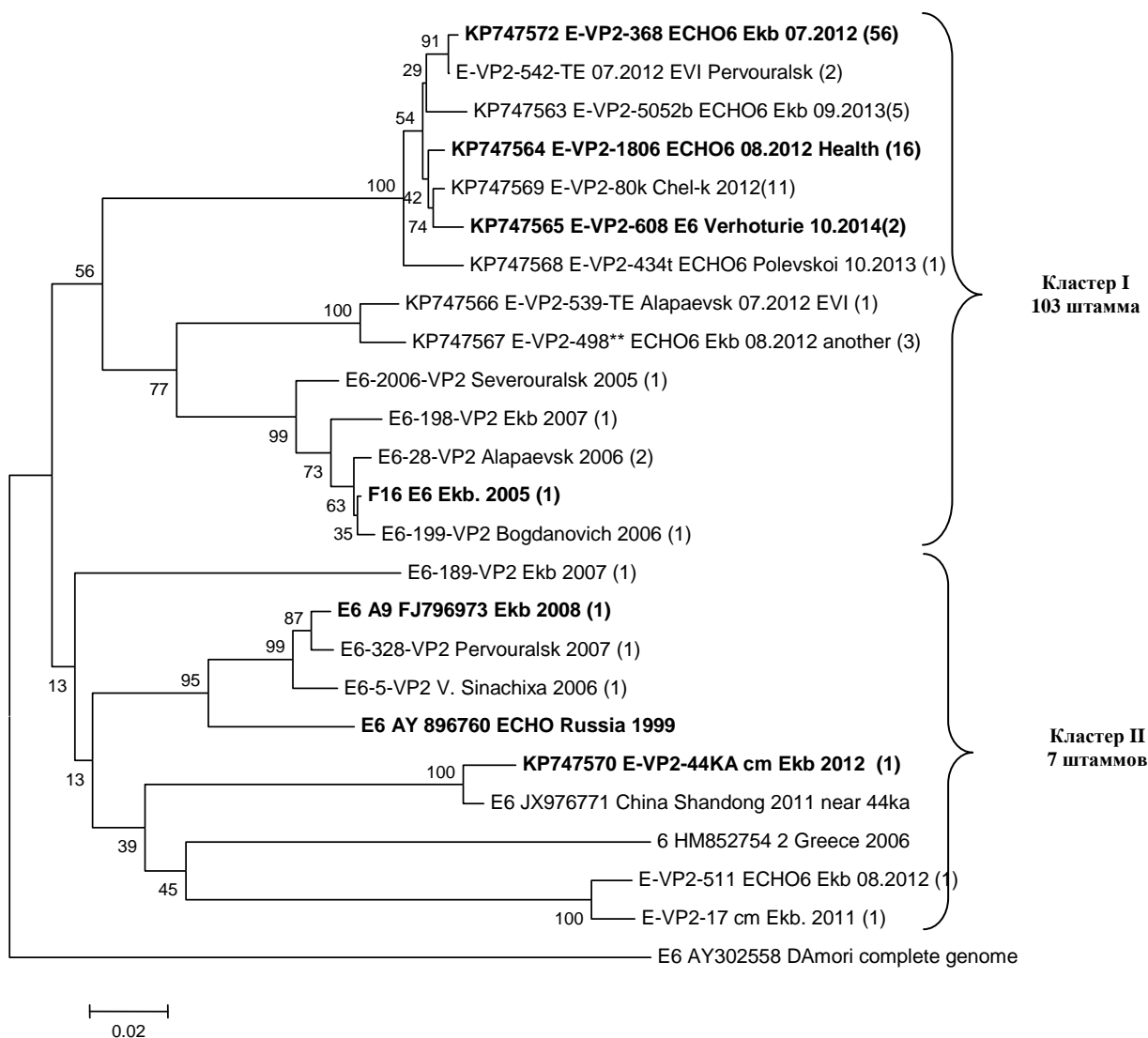


Рисунок 3. Филограмма штаммов вируса ЕСНО6, выявленных в г. Екатеринбурге и на территории Уральского Федерального округа в период с 2005 по 2014 год.

Филогенетический анализ штаммов Коксаки А9, обнаруженных на территории г. Екатеринбурга в период с 2008 по 2014 гг

На филограмме все 53 исследованных штамма группировались с прототипным штаммом вируса CA9 Griggs и объединялись в два четко разграниченных кластера (рис. 4).

Первый кластер представлен 45 штаммами, изолированными от больных ЭВМ в 2008-2013 гг. в г. Екатеринбурге и городах Свердловской области (Серов, Березовский, Первоуральск). В этот же кластер вошли нуклеотидные последовательности четырех штаммов, обнаруженных в пробах фекалий от детей с бессимптомной формой инфекции.

Второй кластер включает четыре штамма, выделенных от больных ЭВМ в Екатеринбурге и Челябинске (2012 г.), Первоуральске и Алапаевске (2013 г.).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на территории г.Екатеринбурга и Свердловской области на протяжении длительного времени

происходит циркуляция генетически близких штаммов вируса СА9, которые периодически обнаруживаются в ликворе больных ЭВМ как в годы эпидемических подъемов заболеваемости, так и в годы относительного эпидемического благополучия.

В 2012-2013 гг. на территории города и области зафиксировано включение в циркуляцию штаммов вируса СА9 иного происхождения, генетически родственных штаммам, выделенным в 2003г. и 2010г. в Канаде.

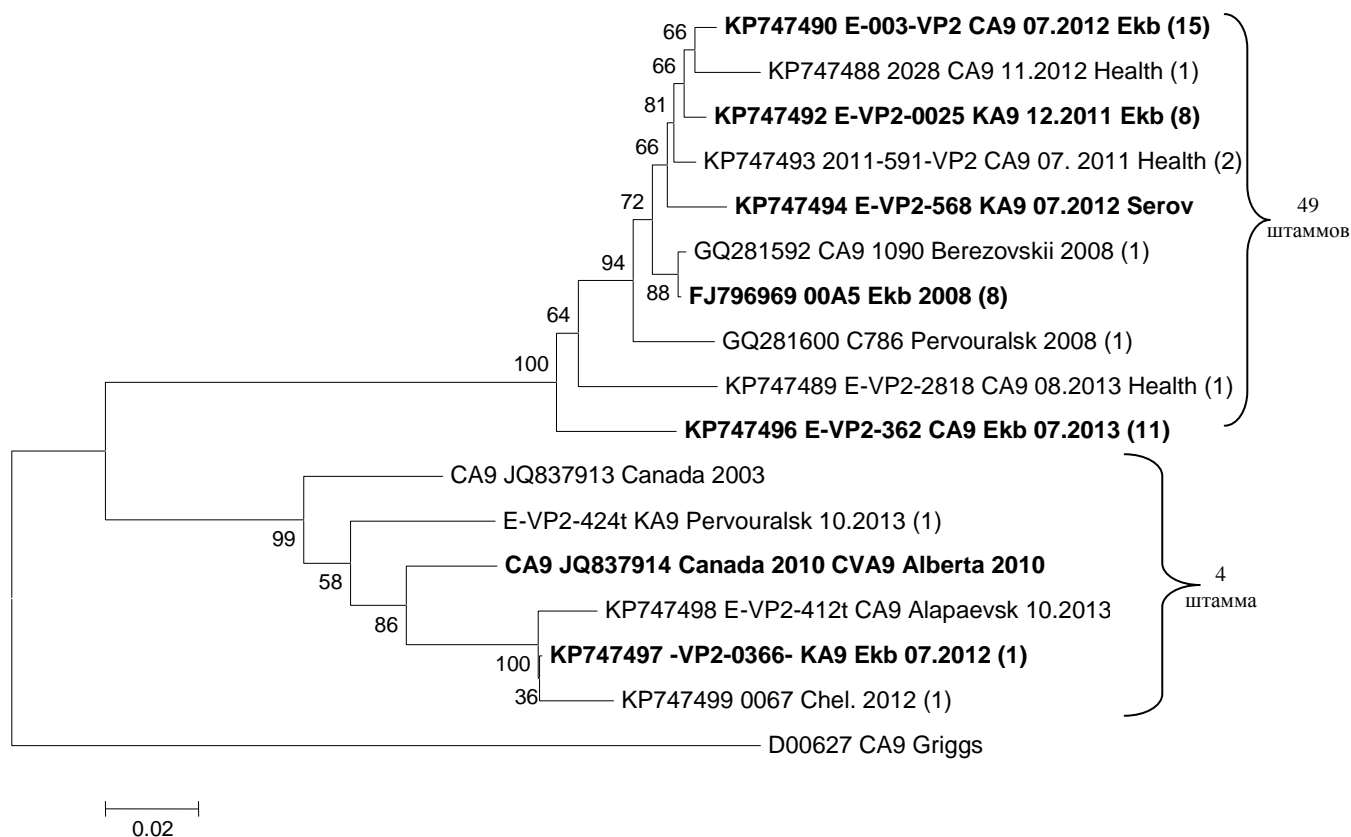


Рисунок 4. Филограмма штаммов вируса Коксаки А9, выявленных в г. Екатеринбурге и Свердловской области в период с 2008 по 2014 год.

Сравнительный анализ спектра и частоты выявления неполиомиелитных энтеровирусов у больных энтеровирусным менингитом и вирусоносителей

При сравнении показателей месячной заболеваемости ЭВМ (на 100 тыс. детей 3-6 лет) и частоты обнаружения НПЭВ у детей индикаторной группы было установлено, что пиковые значения показателя заболеваемости в периоде наблюдения колебались в широких пределах: от 19 (2010 г.) до 170,7 (2013 г.) на 100 тысяч детей возрастной группы 3-6 лет (рис. 5).

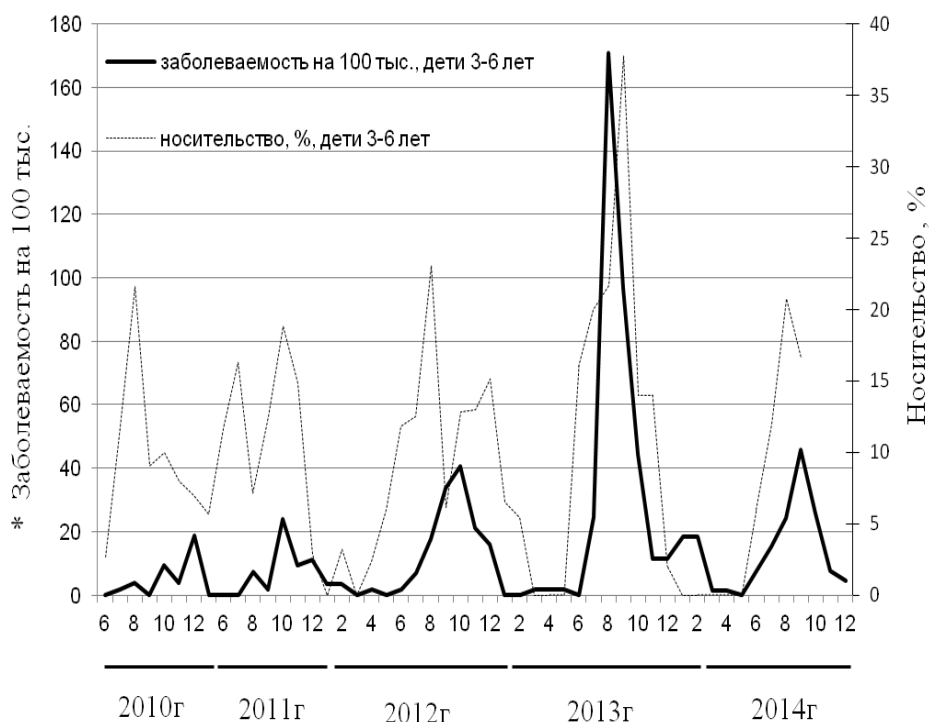


Рисунок 5. Показатели заболеваемости энтеровирусным менингитом и процент вирусывыделителей неполиомиелитных энтеровирусов среди детей г. Екатеринбурга в возрасте 3-6 лет.

* Данные предоставлены отделом эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области.

В то же время, частота бессимптомного вирусоносительства в течение всего периода 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, однако сроки этого опережения в разные годы существенно различались и составляли от одного (2013, 2014 г.г.) до четырех месяцев (2010 г.).

Обращает на себя внимание тот факт, что за период наблюдения пики заболеваемости и интенсивности циркуляции в большинстве случаев не совпадали. На рисунке 6.1 можно отметить 5 вариантов взаимного расположения пиков заболеваемости и вирусоносительства:

1. На фоне существенного повышения процента вирусоносителей выраженный пик заболеваемости отсутствует и появляется на 4 месяца позже (2010 г.);
2. Первый пик носительства предшествует пику заболеваемости, второй совпадает с ним (2011 г.);
3. Первый пик носительства опережает по времени пик заболеваемости, второй запаздывает (2012 г.).

4. Динамика увеличения процента вирусоносителей и повышения уровня заболеваемости практически совпадает (2013 г.).
5. Пиковые значения процента вирусоносителей предшествуют пику заболеваемости (2014 г.).

В годы, когда наблюдались две волны повышения частоты вирусоносительства (2011, 2012 гг.), пик заболеваемости серозным менингитом регистрировался в более поздние сроки (октябрь).

В целом, можно отметить, что процент выявленных вирусовыделителей во время сезонных подъемов может быть относительно высоким при низком уровне заболеваемости серозным менингитом, и наоборот, относительно низким при высокой заболеваемости.

В 2012 году доминирующим серотипом, изолированным как от больных, так и от здоровых лиц практически в равном проценте случаев (41% и 40%, соответственно, $p=0,9$) был вирус ЕСНО6 (рис. 6).

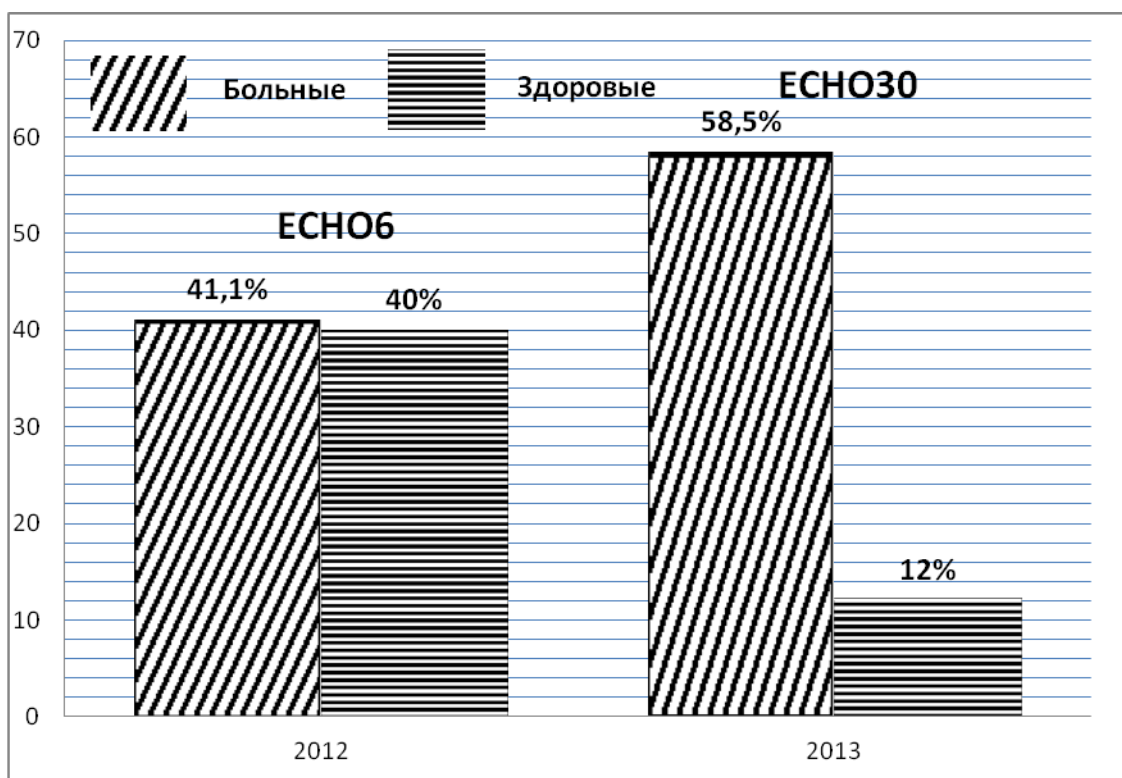


Рисунок 6. Частота встречаемости доминирующих этиологических агентов энтеровирусного менингита среди серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у больных и клинически здоровых лиц.

В 2013г. 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 вирусоносителей данный серотип выделялся в 5 раз реже (58,5% и 12%, соответственно, $p=0,001$). Такое существенное различие в частоте обнаружения штамма энтеровируса в группах больных и здоровых лиц является убедительным

свидетельством в пользу высокой вирулентности включившегося в циркуляцию 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 в довакцинальный период, этот показатель составляет, в среднем, 100:1 [Melnick, J.L., Ledinko, N., 1953].

Для вычисления показателя риска развития ЭВМ при инфицировании детей индикаторной группы доминирующими серотипами НПЭВ, вызвавшими повышенную заболеваемость в г. Екатеринбурге в 2012 и 2013 гг. использовали следующие исходные данные:

1. Показатель заболеваемости ЭВМ на 1000 детского населения в возрасте 3-6 лет; (данные предоставлены отделом эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области).

2. Доля доминирующего этиологического агента ЭВМ среди штаммов, обнаруженных в ликворе больных (рис.6);

3. Частота вирусоносительства (табл. 3);

4. Доля доминирующего этиологического агента среди штаммов, обнаруженных в фекалиях клинически здоровых детей индикаторной группы (рис. 6);

Зная заболеваемость (на 1000 контингента) и долю доминирующего серотипа у больных ЭВМ (%), вычисляли заболеваемость по доминирующему серотипу на 1000 путем составления пропорции (табл. 4).

Аналогичным образом, зная частоту вирусоносительства и долю доминирующего серотипа у носителей (%), вычисляли частоту носительство доминирующего серотипа на 1000 (табл. 4).

Количество инфицированных на 1 случай заболевания вычисляли по формуле:

$$\text{Количество инфицированных на 1 случай заболевания} = \frac{\text{Частота носительства доминирующего серотипа (на 1000)}}{\text{Заболеваемость по доминирующему серотипу (на 1000)}}$$

Таблица 4

Расчет соотношения количества инфицированных доминирующим этиологическим агентом энтеровирусного менингита на один случай заболевания у детей индикаторной группы в возрасте 3-6 лет

Год	Заболееваемость (на 1000 континента)	Доминирующий серотип	Доля доминирующего серотипа у больных ЭВМ (%)	Заболееваемость по доминирующему серотипу (на 1000)	Вирусоносительство (на 1000)	Доля доминирующего серотипа у носителей (%)	Носительство доминирующего серотипа (на 1000)	количество инфицированных на 1 случай заболевания
2012	1,47*	E6	41,1	0,6	114	40	45,6	76:1
2013	3,2*	E30	58,5	1,87	98	12	11,8	6,3:1

*Данные предоставлены отделом эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области.

В результате вычислений было установлено, что риск развития ЭВМ у детей, инфицированных вирусом ЕСНО6 в 2012 г., составил 76:1, тогда как для инфицированных вирусом ЕСНО30 в эпидемическом сезоне 2013 г. он был в 12 раз выше и составлял 6,3:1 (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное можно сделать вывод о том, что сравнительный анализ результатов систематического мониторинга носительства НПЭВ и спектра этиологических агентов ЭВМ дает информацию о масштабах циркуляции, вирулентности включившихся в циркуляцию штаммов, а также позволяет более достоверно оценить вероятность развития неблагоприятной эпидемиологической ситуации по заболеваемости ЭВМ. Соотношение частоты выявления определенного серотипа НПЭВ в фекальном материале практически здоровых лиц и в ликворе больных ЭВМ можно использовать в качестве достоверного показателя эпидемического потенциала штаммов НПЭВ.

Выводы

1. Наиболее информативной возрастной группой для проведения мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения являются дети в возрасте 3-6 лет, у которых среднегодовой уровень вирусоносительства составляет около 10%.

2. Повышение уровня выявляемости НПЭВ опережает рост показателя заболеваемости ЭВМ, однако сроки этого опережения могут варьировать в широких пределах (от одного до четырех месяцев), а процент вирусоносителей, выявленных во время сезонных подъемов, может быть высоким по отношению к среднемесячным показателям при низком уровне заболеваемости ЭВМ и наоборот, относительно низким при высокой заболеваемости.

3. Спектры серотипов НПЭВ, выявленных у вирусоносителей и обнаруженных в ликворе больных ЭВМ, имеют существенные отличия: у практически здоровых лиц преобладает носительство слабовирулентных плохо культивируемых серотипов вирусов Коксаки группы А (виды А и С), в то время как этиологическими агентами ЭВМ являются представители энтеровирусов вида В.

4. Для сезонных подъемов заболеваемости ЭВМ характерным является полиэтиологичность спорадических случаев заболевания: в течение одного эпидсезона в пробах ликвора от больных удается обнаружить более 10 серотипов НПЭВ. За период наблюдения установлена группа наиболее актуальных возбудителей, на долю которых приходилось более 70% случаев заболевания ЭВМ в г. Екатеринбурге (Коксаки А9, ЕСНО 6, 18, 30).

5. Сравнительный филогенетический анализ НПЭВ, выделенных от больных ЭВМ и вирусоносителей (Коксаки А9, ЕСНО 6, 30) показал высокое генетическое родство у штаммов одного серотипа, обнаруженных в одном эпидсезоне в ликворе больных и фекалиях лиц с бессимптомной формой инфекции.

6. Соотношение частоты выявления доминирующего этиологического агента ЭВМ в ликворе больных и в фекальном материале практически здоровых лиц можно использовать для оценки эпидемического потенциала циркулирующих штаммов НПЭВ и расчета ожидаемого показателя заболеваемости в текущем эпидсезоне.

7. Молекулярно-генетический мониторинг циркуляции НПЭВ среди здорового населения позволяет эффективно осуществлять динамическое наблюдение за носительством НПЭВ.

Публикации, содержащие основные научные результаты диссертации, опубликованные в журналах, рецензируемых ВАК

1. **Устюжанин А. В.** Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 году / **А. В. Устюжанин**, А. В. Резайкин, Т. Э. Снитковская, С. В. Скрябина, А. У. Сабитов, Ю. Б. Хаматова, А. Г. Сергеев // Уральский медицинский журнал. 2011. - № 13 (91). - С. 19-24.

2. **Устюжанин А.В.** Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов, циркулирующих среди клинически здоровых (на территории г. Екатеринбурга с 2010 по 2012 г.) / **А. В. Устюжанин**, А. В. Резайкин, А. Г. Сергеев, Я. С. Палицина // Медицинский вестник МВД. - 2013. - № 4 (65). - С. 54-57.

3. **Устюжанин А.В.** Филогенетический анализ вируса ЕСНО6 – возбудителя серозного менингита на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области в период с 2005 по 2012гг / **А.В. Устюжанин**, А. В. Резайкин, Т. Э. Снитковская,

С.В. Скрыбина, А. Г. Сергеев // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - № 9 (246). - С. 35-38.

4. Сергеев А.Г. Оценка эпидемиологической опасности штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих среди населения, по результатам молекулярно-генетического мониторинга / А.Г. Сергеев, **А. В. Устюжанин**, А. В. Резайкин, А. В. Алимов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2015. - № 28 (28). - С. 20-26.

5. **Устюжанин А.В.** Значение молекулярно-генетического мониторинга в оценке степени вирулентности и эпидемической значимости штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих среди населения. / **А. В. Устюжанин**, А. В. Резайкин, А. Г. Сергеев, Т. Э. Снитковская // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2015. - № 1 (52). - С. 72-76.