

Устюжанин А.В.¹, Резайкин А.В.¹, Снитковская Т.Э.²,
Скрябина С.В.², Сабитов А.У.¹, Хаматова Ю.Б.¹, Сергеев А.Г.¹

Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 г.

1 – ГБОУ ВПО "Уральская государственная медицинская академия" Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург, 2 – ФБГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», Управление Роспотребнадзора по Свердловской области, г. Екатеринбург

Ustyuzhanin A.V., Rezaykin A.V., Snitkovskaya T.E., Scryabina S.V., Sabitov A.U., Hamatova J.B., Sergeev A.G.

Analysis of phylogenetic relationships of the enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Yekaterinburg and Sverdlovsk region in 2008

Резюме

Целью данной работы являлось определение этиологической структуры случаев серозного менингита в период сезонного подъёма заболеваемости в г. Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 году, а также установление филогенетических связей этиологических агентов методом молекулярно-генетического типирования. Было исследовано 98 образцов клинического материала от больных серозным менингитом. В 75 образцах методом ПЦР была обнаружена РНК энтеровирусов. Секвенирование структурной части генома энтеровирусов удалось выполнить в 50 образцах. Среди генотипированных штаммов в 38% выявлен вирус ЕСНО30 и в 22% - вирус Коксаки А9. Установлены филогенетические связи выявленных энтеровирусов со штаммами, представленными в базе данных GenBank. Обоснована необходимость применения молекулярно-генетических методов для мониторинга циркулирующих штаммов энтеровирусов.

Ключевые слова: энтеровирусы

Summary

The aim of this study was to establish etiological role of the enteroviruses in cases of aseptic meningitis during the period of seasonal raise of morbidity in Yekaterinburg and Sverdlovsk region in 2008 along with the phylogenetic analysis of the strains identified by molecular genetic typing. 98 clinical specimens from the patients with aseptic meningitis were examined in the laboratory. In 75 specimens enteroviral RNA was detected by RT-PCR. Direct sequencing of PCR-amplified portions of the genome was successfully carried out for 50 specimens. Among the strains identified by genetic typing, echovirus 30 prevalence was equal to 38% and coxsackievirus A9 – 22%. Phylogenetic relationships of the identified enteroviruses with the sequences of enteroviruses available in GenBank database were determined. Significance of the molecular genetic typing of enteroviruses for the epidemiological surveillance is discussed.

Keywords: enteroviruses

Введение

Энтеровирусы человека (семейство Picornaviridae, род Enterovirus) включают в себя более ста серотипов. Согласно современной классификации, основанной на молекулярно-генетических характеристиках, энтеровирусы человека подразделены на четыре вида: А (вирусы Коксаки А2-8, -10, -12, -14, -16, энтеровирусы 71, 76, 89-92 серотипов), В (вирусы Коксаки А9, В1-6, все вирусы ЕСНО, энтеровирусы 69, 73-75, 77-88, -95, -97, 100-101 серотипов), С (полиовирусы, вирусы Коксаки А1, -11, -13, -15, 17-22, -24, энтеровирус 96 серотипа) и D (энтеровирусы 68, 70 и 94 серотипов) [1, 2].

Неполиомиелитные энтеровирусные инфекции (ЭВИ) характеризуются многообразием клинических проявлений. В большинстве случаев они протекают бессимптомно или в лёгкой форме, сопровождаемая лихорадочным состоянием и(или) кишечным расстройством, однако возможны и тяжелые формы, такие как серозный менингит, менингоэнцефалит, миокардит, острый вялый парез, острый геморрагический конъюнктивит, энтеровирусный увеит и другие [3,4].

Энтеровирусы являются основными этиологическими агентами серозного менингита. На их долю приходится от 85 до 95% всех случаев этого заболевания с уста-

новленной этиологией. Большая часть вспышек серозного менингита, зарегистрированных в последние годы в разных странах мира, была вызвана эховирусами различных серотипов [5].

В Свердловской области ежегодно наблюдаются случаи заболевания менингитом энтеровирусной этиологии. За последние 4 года (2007 – 2010) серозным менингитом в области заболело 1387 человек, среди них 1160 – дети в возрасте до 14 лет.

Периодичность эпидемических подъемов и продолжительность межэпидемических периодов в течение последних 15 лет составляла 3 – 4 года. С 2007 года по 2010 год в области наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости (с 4,61 до 0,5 на 100 тысяч населения). Несмотря на невысокие показатели по области, для города Екатеринбурга серозные менингиты энтеровирусной этиологии представляли серьезную проблему. Так, в 2007 году уровень заболеваемости в городе почти в 3 раза превышал средний показатель по области и достигал 12,7 на 100 тысяч населения. В 2008 году, при общем снижении количества зарегистрированных энтеровирусных инфекций в области (показатель 3,9 на 100 тысяч), в городе было зарегистрировано 349 случаев серозного менингита (показатель 12,3 на 100 тысяч). К 2010 году заболеваемость серозными менингитами в городе снизилась до уровня 0,07 на 100 тысяч населения.

Летне-осенняя сезонность ЭВИ, регистрировавшихся в Свердловской области, является традиционной для стран с умеренным климатом. Подъем заболеваемости серозным менингитом начинался в июне, пиковые уровни наблюдались в августе-сентябре, и спад регистрации случаев заболевания продолжался до декабря-января. Короткий период эпидемического благополучия составлял 3 месяца: с марта по май.

Как в Свердловской области, так и в Екатеринбурге, в возрастной структуре заболевших менингитами энтеровирусной этиологии преобладали дети в возрасте до 14 лет. Показатели заболеваемости ЭВИ в месяцы подъёмов в 2007 году составляли 2,7 (на 100 тысяч населения) по области и 7,18 по Екатеринбургу. В период регистрации низкой заболеваемости (2010 год) показатели по городу и по области снизились до 0,26 на 100 тысяч населения. Среди детей наибольшая поражённость ЭВИ наблюдалась в возрастной группе 3 – 6 лет. В годы подъёмов заболеваемости энтеровирусными инфекциями (2007 и 2008 годы) регистрация серозных менингитов в Екатеринбурге превышала средний областной показатель почти в 3 раза: 15,1 на 100 тысяч по городу по сравнению с 5,9 на 100 тысяч по области в 2007 году и, соответственно, 6,8 по сравнению с 2,55 на 100 тысяч в 2008 году.

За 12 лет (с 1998 по 2010 год) в Свердловской области зарегистрировано 5 крупных вспышек ЭВИ. В 1998 году в Красноуфимском районе показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составлял 30,7; в 2000 и 2006 годах в Алапаевске – 180 и 203, соответственно; в 2004 году в Екатеринбурге – 30,9; и в 2005 году в Североуральске – 110. Все указанные вспышки характеризовались одним эпидемическим пиком заболеваемости и полимор-

физмом клинических проявлений инфекции.

Расшифровка этиологии sporadicческих случаев и вспышек заболеваний серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области до 2008 г. проводилась с помощью традиционного вирусологического метода выделения вирусов на клеточных культурах RD, Herp-2, L20B, что существенно ограничивало возможности индикации и идентификации труднокультивируемых и некультивируемых энтеровирусов. Вследствие этого, в этиологической структуре серозных менингитов фигурировал относительно узкий спектр энтеровирусов, в основном, типлируемых во время локальных вспышек (Красноуфимский район, 1998 г. – ЕСНО6; г.Алапаевск, 2000 г. - ЕСНО30, г.Екатеринбург, 2004 – ЕСНО30; г.Североуральск 2005г. – ЕСНО6; г.Алапаевск, 2006г. – ЕСНО6) [6]. В этиологии sporadicческих случаев заболевания серозным менингитом в г. Екатеринбурге на протяжении 5 лет (2000-2005 г.г.), по результатам культурального метода, доминировали вирусы Коксаки группы В [7].

В настоящее время существенное повышение эффективности этиологической диагностики энтеровирусных инфекций может быть достигнуто за счет использования современных методов молекулярно-генетического анализа путем индикации и идентификации возбудителя непосредственно в первичном материале от больного, минуя стадию выделения чистой культуры возбудителя в культуре клеток.

Целью данной работы явилась идентификация этиологических агентов, вызвавших сезонный подъём заболеваемости энтеровирусным серозным менингитом в г.Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 году, а также установление филогенетических связей возбудителей методом молекулярно-генетического типирования.

Материалы и методы

Исследовали 98 образцов клинического материала (фекалии, спинно-мозговая жидкость, носоглоточные смывы) от больных серозным менингитом, находившихся на лечении в инфекционном отделении городской клинической больницы №40 г. Екатеринбурга, с июня по октябрь 2008 года.

Выделение вирусной РНК проводили методом сорбции на силикагелевом носителе. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали ревертазу M-MLV и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов. Наличие энтеровирусной РНК в пробе подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (комплекты реагентов "РИБО-сорб", "РЕВЕРТА-L-100", "АмплиСенс Энтеровирус-207" производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Для идентификации обнаруженных энтеровирусов и последующего молекулярно-эпидемиологического анализа был выбран участок генома, включающий часть 5'-нетранслируемой области, всю последовательность белка VP4 и начальную часть последовательности белка VP2 (всего 658 оснований) [8,9].

Аmplификацию выбранного участка проводили с помощью полугнездной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с олигонуклеотидными праймерами (производство ЗАО "Синтол", Москва) 3F-TCCTCCGGCCCTGAATG (нуклеотиды 449 - 466 по последовательности прототипного штамма ECHO11, номер в GenBank X80059), 4F-TACTTTGGGTGTCCTGTTC (нуклеотиды 548 - 568) и 5R-GGCAACTTCCACCACCACC (нуклеотиды 1206 - 1187) [8].

Для проведения первого раунда ПЦР готовили 25 мкл реакционной смеси, включавшей: 2 ед. ДНК-полимеразы (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), 0,2 мМ смесь dNTP, по 5 пмоль праймеров 3F и 5R, реакционный буфер (67 мМ Трис-НСI (рН 8,3), 2,0 мМ MgCl₂), 10 мкл κДНК.

ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл – 95°C – 5 минут; 42 цикла – 95°C – 20 секунд, 55°C – 1,5 минуты, 72°C – 40 секунд; и заключительный цикл – 72°C – 5 минут. Во втором раунде полугнездной ПЦР использовали аналогичную реакционную смесь с праймерами 4F и 5R, и 1 мкл амплификата, полученного в предыдущей реакции. Схема проведения второго раунда: 1 цикл – 95°C – 5 минут; 30 циклов – 95°C – 20 секунд, 58°C – 1 минута, 72°C – 40 секунд; 1 цикл – 72°C – 5 минут.

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Секвенирование ДНК проводили по прямой и обратной последовательностям с праймерами 4F и 5R 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 3.1 [10].

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. Учитывая высокую частоту рекомбинаций в 5' нетранслируемой области генома энтеровирусов [11], при поиске максимально схожих штаммов использовали участок генома, кодирующий структурные белки VP4 –VP2 (приблизительно 400 оснований).

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%.

Нуклеотидные последовательности идентифицированных штаммов депонированы в GenBank под номерами FJ752575 - FJ752584 и FJ796966 - FJ796988.

Результаты и обсуждение

Из 98 проб клинического материала, исследованных методом ПЦР, в 75 образцах была обнаружена РНК энтеровирусов (%). Успешное секвенирование структурной части генома удалось выполнить в 50 образцах (таблица 1).

Результаты генотипирования свидетельствуют о достаточно широком спектре энтеровирусов, выступающих в качестве этиологических агентов сезонного подъема заболеваемости серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области. Все идентифицированные энтеровирусы (11 серотипов) относились к виду В. Среди них преобладали вирусы ECHO (38 из 50 штаммов), причем доминирующим являлся вирус ECHO30 (19 штаммов).

Вторая по численности группа идентифицированных штаммов была представлена вирусами Коксаки А9 (11 штаммов). Из них шесть штаммов вируса Коксаки А9 были идентифицированы в случаях заболевания серозным менингитом, зарегистрированных как локальная вспышка в ДОУ Чкаловского района г. Екатеринбурга. Доля данного вируса в этиологической структуре спо-

Таблица 1. Результаты генотипирования энтеровирусов, обнаруженных в образцах клинического материала от больных серозным менингитом из г. Екатеринбурга и Свердловской области (n=50)

Серотип	Количество штаммов	%
ECHO 30	19	38
Coxsackievirus A9	11	22
ECHO 11	4	8
ECHO 17	4	8
ECHO 7	3	6
ECHO 14	3	6
ECHO 6	2	4
ECHO 5	1	2
Coxsackievirus A1	1	2
Coxsackievirus B3	1	2
Coxsackievirus B5	1	2
ВСЕГО	50	100

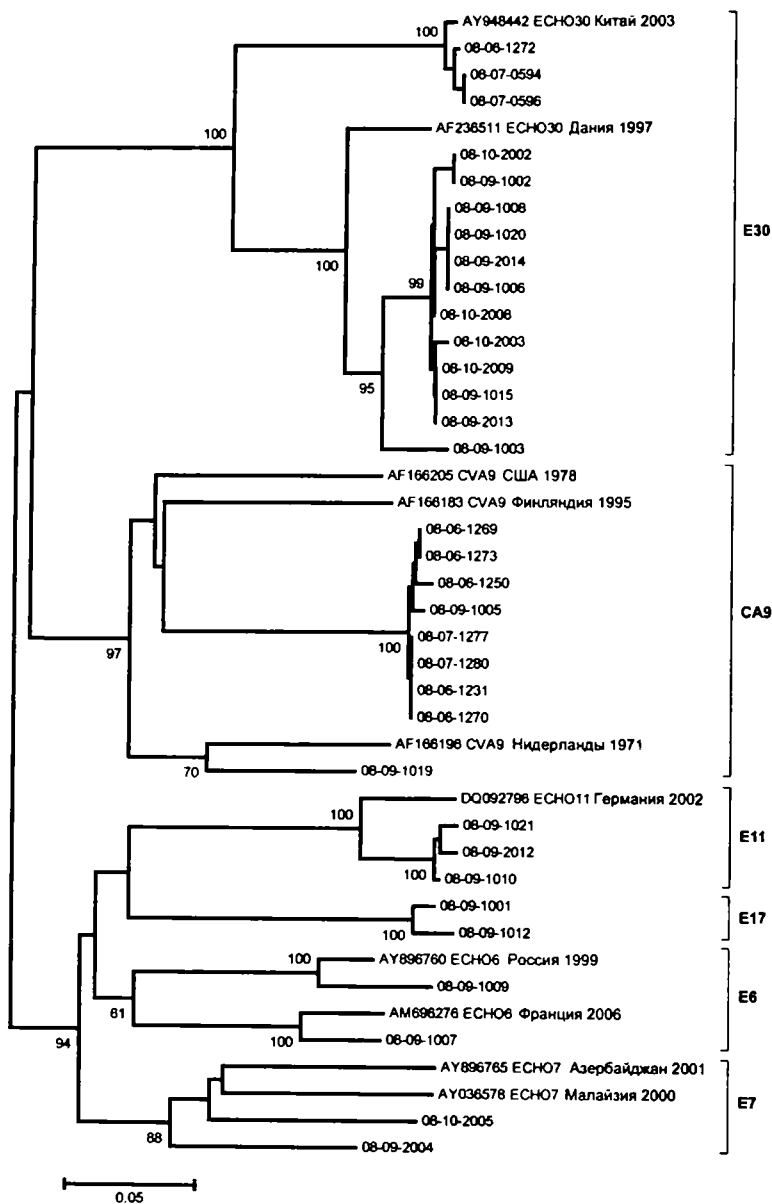


Рисунок 1. Филогенетические взаимоотношения штаммов энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом. Числа в узлах филограммы – индекс поддержки (% bootstrap на 1000 построений). Прототипные штаммы указаны под номерами базы данных GenBank. Исследованные штаммы обозначены 8-значными номерами: первая и вторая цифры – год, третья и четвертая – месяц выделения штамма. Основные кластеры выделены квадратными скобками. Линейка под рисунком указывает относительную филогенетическую дистанцию.

радикальной заболеваемости составила 22%.

Следует отметить, что вирусы ECHO6, ECHO11, ECHO30 и вирус Коксаки B5 в качестве этиологических агентов серозного менингита регистрировались на территории Свердловской области и в предыдущие годы. Вирусы ECHO5, ECHO7, ECHO14, ECHO17, вирусы Коксаки A9 и A1 у больных серозным менингитом из г. Екатеринбург и Свердловской области были выявлены нами

впервые. Перечисленные серотипы относятся к некультивируемым или труднокультивируемым энтеровирусам, поэтому они не могли быть выявлены ранее традиционным культуральным методом.

Филогенетические взаимоотношения выявленных энтеровирусов, отражающие степень их генетического родства со штаммами, ранее описанными в литературе, представлены на рисунке 1. В филогенетическом древе

можно выделить шесть кластеров, объединяющих наиболее часто встречающиеся штаммы (ЕСНО 30, 11, 17, 7, 6 и Сохsackievirus А9) с соответствующими референтными штаммами, нуклеотидные последовательности которых депонированы в базе данных GenBank.

Из представленной филограммы видно, что часть штаммов ЕСНО30 достоверно группируется с вирусом ЕСНО30, выделенным в 2003 году в Китае, в то время как другая часть имеет общее происхождение с вирусами ЕСНО 30, выделенными в конце 90-х годов в Западной Европе. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что на территории Свердловской области и г. Екатеринбурга в течение одного эпидемического сезона широко циркулировали и вызывали заболевания серозным менингитом штаммы одного серотипа ЕСНО30, имеющие разное филогенетическое происхождение. Аналогичная ситуация наблюдалась с вирусами ЕСНО6 и Коксаки А9. Результаты, представленные на филограмме, свидетельствуют об одновременной циркуляции, по крайней мере, двух штаммов различного происхождения, относящихся к одному серотипу названных вирусов.

Таким образом, результаты молекулярно-эпидемиологического анализа показали, что подъем заболеваемости серозным менингитом в летне-осенний период 2008 года в г.Екатеринбурге и Свердловской области был обусловлен циркуляцией, как минимум, одиннадцати серотипов энтеровирусов вида В. Доминирующее положение в этиологической структуре занимал вирус ЕСНО 30, на втором месте по этиологической значимости был вирус Коксаки А9. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными о выделении вирусов разных серотипов во время эпидемического подъема заболеваемости серозным менингитом [6].

Устюжанин А.В., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Резайкин А.В., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Снитковская Т.Э., врач вирусолог лаборатории контроля биологического фактора ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», г. Екатеринбург; Скрыбина С.В., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Свердловской области, г. Екатеринбург; Сабитов А.У., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детских инфекционных болезней и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Хаматова Ю.Б., к.м.н., доцент кафедры детских инфекционных болезней и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Сергеев А.Г. д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Устюжанин Александр Владимирович, 620000 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3, тел: 8-908-924-94-19, e-mail: ust103@yandex.ru

Литература:

1. Huynh T., Hovi T., Knowles N.J., Stanway G. / Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties // Journal of General Virology. -1997. - 78 (Pt 1). - P.1-11.
2. Stanway G., Brown F., Christian P. et al. / Family Picornaviridae, p. 757-778 In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (eds.), Virus Taxonomy. 2005, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.
3. Rotbart H.A., Hayden F.G. / Picornavirus infections: a primer for the practitioner. // Archives of family medicine. -2000. -Vol.9 -P.913-920.
4. Лашкевич В.А., Королева Г.А., Лукашев А.Н и соавт. / Острый энтеровирусный увеит у детей раннего возраста // Вопросы вирусологии.-2005. -Т.50, и3. -С.36-45.
5. Rotbart H.A. Viral meningitis. // Seminars in neurology. -2000. -20(3). -P:277-92.
6. Снитковская Т.Э., Скрыбина С.В., / Характеристика энтеровирусных инфекций в Свердловской области. // Уральский медицинский журнал. - 2008. и8(48).-С.146-149

7. Беседина Л. Г., Субботина Н. С., Сбитнева Н. Н., Бейкин Я. Б. / Особенности циркуляции энтеровирусов в г. Екатеринбурге (1992-2005гг.) // Уральский медицинский журнал. – 2006. Спецвыпуск: «Микробиология». Ноябрь, -С.19-22
8. Arola A., Santti J., Ruuskanen O., Halonen P., Нуурпя Т. /Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis // Journal of Clinical Microbiology. -1996. -Vol.34 -P.313-318.
9. Casas I., Palacios G.F., Trallero G., Cisterna D., Freire M.C., Tenorio A. / Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products // Journal of Medical Virology. -2002. -Vol.65. -P.138-148.
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. / MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. -2004. -Vol.5 -P.150-163.
11. Simmonds P., Welch J. / Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses // Journal of Virology, -2006, -Vol.80, No. 1. -P.483-493.
12. Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е. и соавт. / Молекулярная эпидемиология вируса ECHO 6 — возбудителя вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. // Вопросы вирусологии. -2008. -Т.53, ц1. -С.16-21.