

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
заведующий кафедрой микробиологии,  
вирусологии и иммунологии  
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России  
профессор Сергеев А.Г.

**Санкт-Петербург – 2017**

Оглавление	
Список сокращений .....	4
Введение.....	5
Глава 1. Анализ информативности санитарно-вирусологических и клинических вирусологических исследований для оценки интенсивности циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов среди населения (обзор литературы). .....	13
1.1 Информативность результатов санитарно-вирусологических исследований для оценки эпидемиологической ситуации по заболеваемости энтеровирусными инфекциями. ....	13
1.2 Индикация энтеровирусов в пробах фекалий лиц с бессимптомной формой инфекции.....	21
Глава 2. Материалы и методы.....	30
2.1 Материалы .....	30
2.2 Методы .....	33
Глава 3. Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у больных асептическим менингитом и у детей с бессимптомной формой инфекции .....	41
3.1. Спектр серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных в ликворе больных энтеровирусным менингитом в период наблюдения с 2008 по 2014 гг.....	41
3.2 Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у детей с бессимптомной формой инфекции.....	49
Глава 4. Филогенетическая характеристика штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих в Свердловской области .....	55
4.1. Филогенетический анализ штаммов вируса ЕСНО30 выделенных в 2007-2014гг. ....	55
4.2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вируса ЕСНО6, выделенных на территории Свердловской области в 2005-2014 гг. ....	71

4.3. Филогенетический анализ штаммов вируса Коксаки А9, обнаруженных на территории г. Екатеринбурга в период с 2008 по 2014 гг. ....	81
Глава 5. Сравнительный анализ спектра и частоты выявления неполиомиелитных энтеровирусов у больных энтеровирусным менингитом и здоровых лиц. ....	91
Обсуждение.....	99
Список литературы .....	112
Приложение 1 .....	140
Список регистрационных номеров нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VP1 штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, задепонированных в базе данных GenBank .....	140
Приложение 2 .....	145
Список регистрационных номеров нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VP2 штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, задепонированных в базе данных GenBank .....	145

## Список сокращений

**НПЭВ** – неполиомиелитные энтеровирусы

**ЭВМ** – энтеровирусный менингит

**СМ** – серозный менингит

**ЭВ (EV)** – энтеровирусы

**СА** – вирусы Коксаки группы А

**СВ** – вирусы Коксаки группы В

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция

**ОТ-ПЦР** – полимеразная цепная реакция с предварительной реакцией обратной транскрипции

## **Введение**

Неполиомиелитные энтеровирусы человека (НПЭВ) входят в семейство Picornaviridae, род Enterovirus и включают в себя более ста серотипов, ранее подразделяемых на группы Коксаки А и В, ЕСНО и группу энтеровирусов (EV) с присвоенными порядковыми номерами, начиная с EV 68 [163, 165].

Согласно современной классификации, основанной на молекулярно-генетических характеристиках, энтеровирусы человека подразделены на четыре вида: вид А (вирусы Коксаки А 2-8, -10, -12, -14, -16, EV 71, 76, 89-92, -114 серотипов), вид В (вирус Коксаки А9, Коксаки В1-В6, все вирусы ЕСНО, EV 69, 73-75, 77-88, -93, -97, -100, -101, -106, -107, -110), вид С (полиовирусы, вирусы Коксаки А1, -11, -13, -15, 17-22, -24, EV -95, -96, -99, -102, -104, -105, -109, -113, -116) и вид D (EV -68, -70, -94, -111) [7, 97, 111, 136, 165, 181].

Неполиомиелитные энтеровирусные инфекции (ЭВИ) характеризуются многообразием клинических проявлений. В большинстве случаев они протекают бессимптомно или в лёгкой форме, сопровождаясь лихорадочным состоянием и (или) кишечными расстройствами, однако возможны и тяжелые формы, такие как менингоэнцефалит, острый вялый парез, асептический менингит, миокардит, острый геморрагический конъюнктивит, энтеровирусный увеит, сепсисоподобное заболевание у новорожденных и другие [9, 19, 23, 29, 34, 38, 44, 97, 173]. Имеются сведения о наличии связи между инфицированием ЭВ и развитием миокардита, диабета первого типа [114].

НПЭВ являются основными этиологическими агентами асептического менингита [48, 76, 129, 133, 134, 139, 141, 146, 155, 169, 170, 184]. На их долю приходится от 85 до 95% всех случаев этого заболевания с установленной этиологией [77, 108, 126, 166]. Большая

часть вспышек энтеровирусного менингита (ЭВМ), зарегистрированных в последние годы в разных странах мира, была вызвана вирусами ЕСНО различных серотипов [4, 5, 13, 49, 110, 112, 113, 172, 175, 183].

В возрастной структуре клинических форм ЭВИ преобладает детское население. Для стран с умеренным климатом характерными являются летне-осенние подъемы уровня заболеваемости ЭВМ, причем, этиологическими агентами чаще всего являются несколько серотипов НПЭВ с явным доминированием одного из них [4, 35, 47, 67, 71, 127, 161].

Особенностью ЭВ является высокий уровень их изменчивости, обусловленный как частотой мутаций, так и внутривидовой и межвидовой рекомбинацией [28, 130, 143, 145, 149, 151, 159, 179].

Показано, что повышению уровня заболеваемости ЭВИ практически всегда предшествует появление нового для территории геноварианта вируса, или давно не обнаруживаемого серотипа [6, 12, 21, 24, 71].

В г. Екатеринбурге и Свердловской области систематическое наблюдение за заболеваемостью ЭВМ проводится с 1970 года. Отмечено волнообразное течение эпидемического процесса с периодами подъема и снижения заболеваемости, которая по результатам многолетнего наблюдения в несколько раз превышает средние показатели заболеваемости в Российской Федерации [11, 80, 82]. Однако многие вопросы, связанные с краткосрочными и, тем более, долгосрочными прогнозами развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ, остаются нерешенными [10, 55, 94].

Актуальность проблемы 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 [56, 67, 72, 87, 94, 109].

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 [69]. 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) [41, 53, 57, 58, 83, 106, 157].

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 [128, 189].

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 [74, 75, 190]. 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 [5, 37, 181].

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

- как связан рост заболеваемости ЭВИ с интенсивностью циркуляции НПЭВ среди населения крупного промышленного центра;



- каково соотношение циркулирующих серотипов НПЭВ с частотой их встречаемости в качестве этиологических агентов ЭВИ;

- по каким критериям можно оценить степень вирулентности циркулирующих штаммов НПЭВ 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, циркулирующих на данной территории среди здорового населения.

**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 вирусносительства 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 критерий, позволяющий оценить эпидемический потенциал выявленных штаммов НПЭВ по результатам учета соотношения процента выявления определенного серотипа в ликворе больных ЭВМ и частоты его обнаружения у лиц с бессимптомной энтеровирусной инфекцией.

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, циркулирующих среди населения на территории Уральского Федерального округа в период с 2005 г. по 2014 г. (Приложение 1,2).

### **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.

## **Глава 1. Анализ информативности санитарно-вирусологических и клинических вирусологических исследований для оценки интенсивности циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов среди населения (обзор литературы).**

### **1.1 Информативность результатов санитарно-вирусологических исследований для оценки эпидемиологической ситуации по заболеваемости энтеровирусными инфекциями.**

Изучение распространения НПЭВ в человеческой популяции имеет более чем 60-летнюю историю - с момента открытия вирусов Коксаки (1948 г.) и ЕСНО (1952 г.) [15, 153, 164]. Объектами исследования для изучения циркуляции НПЭВ служат образцы биологического материала от больных с подозрением на ЭВИ (фекалии, смыв из зева, ликвор), практически здоровых лиц (фекалии) и пробы из объектов окружающей среды (сточные воды).

Основным методом индикации и идентификации НПЭВ до настоящего времени остается вирусологический метод исследования, хотя последние годы отмечены все боле

е широким внедрением в практику молекулярно-генетических методов индикации и идентификации НПЭВ.

1.1. Результативность и информативность вирусологического исследования сточных вод в системе эпидемиологического надзора за энтеровирусными (не полио) инфекциями.

История санитарной вирусологии сточных вод связана с проблемой изучения эпидемиологии полиомиелита. Впервые вирус полиомиелита из сточных вод удалось выделить в 1942 г.: Paul и Frack в США, Kling et al. в Швеции [142, 167, 185].

В настоящее время исследование сточных вод является составной частью эпидемиологического надзора за циркуляцией полиовирусов в

рамках программы глобальной ликвидации полиомиелита, принятой в 1988 году [135, 187].

Первые сообщения о присутствии в сточных водах НПЭВ появились в 1957 г. [137, 138]. Авторы приводят результаты вирусологического исследования 308 проб сточных вод в двух населенных пунктах штата Нью-Йорк. Энтеровирусы были выявлены в 63% проб, причем, вирусы Коксаки группы В обнаруживались в два раза чаще, чем полиовирусы (42% и 21%, соответственно). В 1958 г. Mask et al. сообщили о выделении из 1403 проб сточных вод в г. Лансинг (США) 116 штаммов энтеровирусов (8,4%), среди которых преобладали вирусы Коксаки В и ЕСНО. В последующие годы появились сообщения о результатах выделения энтеровирусов из городских сточных вод в штатах Айова, Калифорния, Иллинойс с частотой положительных проб от 10 до 80% [186].

Первые результаты санитарно-вирусологических исследований сточных вод свидетельствовали о том, что среди здорового населения, в основном, циркулируют неполиомиелитные энтеровирусы, и что масштабы этой циркуляции могут варьировать в очень широких пределах.

Многочисленные исследования сточных вод крупных городов государств Западной Европы на наличие НПЭВ, проведенные в конце 50-х, начале 60-х годов XX столетия подтвердили повсеместность круглогодичного носительства НПЭВ среди населения с повышением уровня их циркуляции в летне-осенний период [132, 176].

Первые сообщения о выделении НПЭВ из сточных вод на территории СССР были опубликованы в 1963 г. В последующие 10 лет аналогичные исследования были проведены в крупных городах Российской Федерации, Украины, Прибалтики, Средней Азии [25, 26, 84].

Частота обнаружения энтеровирусов в сточной воде, по данным советских исследователей, в большинстве случаев составляла 15-40%, однако в некоторых случаях могла достигать 70-80% [8, 17, 18, 27, 32, 39, 50, 51, 63, 68, 73, 86, 107].

В проспективном исследовании было показано, что процент положительных находок НПЭВ в сточных водах одного и того же населенного пункта подвержен существенным колебаниям. Так, по данным Эргашева и соавт. в сточных водах г. Ташкента в 1965-67гг. энтеровирусы были обнаружены в 38% проб, в 1968-1969гг. - в 22,2%, а в 1970г. - в 13,3% исследованных проб [105].

В работе Н.К.Кутсар (1973) показано изменение типового состава НПЭВ, обнаруживаемых в сточных водах г. Таллина на протяжении трехлетнего периода. Если в 1967г. обнаруживались только вирусы Коксаки группы В, то в 1968г. – Коксаки В1, ЕСНО 1,7,11, а в 1969 г. – Коксаки В1,3,5 и ЕСНО7 [84]. Целью вирусологического исследования сточных вод является получение информации о масштабах циркуляции НПЭВ среди населения и спектре циркулирующих серотипов. Однако четких рекомендаций по дальнейшему использованию полученной информации для оперативного анализа, предэпидемической диагностики и составления эпидемиологического прогноза в доступной литературе нами не обнаружено.

Многочисленные работы посвящены изучению связей между частотой обнаружения НПЭВ в сточных водах и уровнем заболеваемости ЭВИ, между сроками обнаружения актуального серотипа в сточной воде и эпидемического подъема заболеваемости, ассоциированного с ним.

В целом, авторы отмечают ежегодное повышение частоты выявления НПЭВ в сточных водах в летне-осенний период как при низких, так и при высоких показателях заболеваемости ЭВИ, а,

появление в сточной воде эпидемически значимого серотипа НПЭВ предшествует подъему заболеваемости ЭВИ [33].

Так, при описании выраженного подъема заболеваемости ЭВМ в августе-октябре 2007 году в Нижнем Новгороде авторы отмечают, что вирус ЕСНО30 (доминирующий этиологический агент асептического менингита) начал обнаруживаться в сточных водах в июле, то есть обнаружение эпидемически значимого штамма на месяц предшествовало подъему заболеваемости [62].

Комментируя вывод, сделанный авторами статьи, следует отметить, что, во-первых, сам факт выявления в сточной воде указанного серотипа среди прочих не мог служить достаточным основанием для отнесения его к категории «эпидемически значимых». Во-вторых, нельзя не учитывать промежуток времени от момента отбора пробы до получения результата вирусологического исследования (3-4 недели), из чего следует, что выявление вируса ЕСНО30 в сточной воде по времени фактически совпадало с началом подъема заболеваемости, то есть, использовать полученную информацию для прогноза развития эпидпроцесса фактически не представлялось возможным.

Имеются данные о продолжительности периода, в течение которого обнаруживалось присутствие возбудителя ЭВМ в городских стоках г. Иркутска. Вирус ЕСНО30, вызвавший подъем заболеваемости ЭВМ и обнаруженный в сточных водах в 2003 году, продолжал регулярно выделяться из стоков с 2004 г. по 2010 г. [20]. Столь длительный период времени, в течение которого возбудитель присутствовал в сточной воде, свидетельствует о продолжении его активной циркуляции среди населения в межэпидемический период. Полученные результаты говорят о том, что сам факт обнаружения того или иного серотипа в сточной воде не может быть однозначно интерпретирован и, следовательно, использован для оценки эпидситуации и составления эпидемиологического прогноза.



В отношении совпадения спектра больных ЭВИ и из сточных вод данные литературы противоречивы. По данным некоторых авторов, серотипы НПЭВ, выделенные от больных ЭВИ и из проб сточных вод совпадают [3, 81, 143]. Однако, при ближайшем рассмотрении, оказывается, что совпадает лишь часть серотипов, причем, доминирующие этиологические агенты ЭВИ присутствуют в пробах сточных вод наряду с прочими серотипами. Вследствие этого, перед началом эпидсезона не представляется возможным предсказать, какой из обнаруженных в сточной воде серотипов вызовет рост заболеваемости ЭВИ и насколько она возрастет.

В некоторых работах приводятся данные, отражающие несоответствие не только спектра, но и доминирующих серотипов НПЭВ, выделенных из проб сточной воды и от больных. Так, в Краснодарском крае в течение 10 лет наблюдения (2002-2012 г.г.) на наличие НПЭВ было исследовано 2004 пробы сточных вод. Выделяемость энтеровирусов в течение периода наблюдения была низкой и в разные годы составляла от 0 до 8,2% (в среднем, около 3%). При этом в 63% положительных проб были обнаружены вирусы Коксаки группы В. В то же время, в образцах клинического материала от больных ЭВМ с наибольшей частотой (от 60% до 100% в разные годы) обнаруживались вирусы ЕСНО [64, 186, <http://www.cgekuban.ru/publication/epid/enterovir.php>].

Внедрение в практику метода ПЦР позволило существенно повысить частоту обнаружения ЭВ в объектах окружающей среды. Результаты динамического исследования сточных вод в рамках программы эпидемиологического надзора за НПЭВ, проведенные в г. Чите в 2009–2011 гг. (374 пробы), показали, что с помощью ПЦР энтеровирусы обнаруживаются почти в 2 раза чаще, чем при классическом вирусологическом исследовании (в 60,3% и 36,3% проб, соответственно). Такая существенная разница результатов

свидетельствует в пользу того, что около половины циркулирующих штаммов не обладают цитопатогенным действием и при использовании вирусологического метода остаются вне поля зрения исследователей. В общей структуре энтеровирусов, выделенных культуральным методом (137 штаммов), доля полиовирусов составила 24,8%. Среди выделенных НПЭВ преобладали вирусы Коксаки группы В (66,6%). [45].

Попытки оценки масштабов циркуляции энтеровирусов, обнаруженных в сточной, среди населения проводились только в отношении вирусов полиомиелита [63]. Следует отметить, что данные разных авторов по соотношению числа вирусовыделителей к количеству неинфицированных лиц, при котором удается выделить полиовирусы в культуре клеток, различаются в 25 раз: от 1: 400 до 1:10000. В пересчете на показатели инфицированности, полиовирусы с высокой долей вероятности могут быть выделены из сточных вод, если уровень вирусоносительства среди населения  $\geq 250$  (или, по другим данным,  $\geq 10$ ) на 100000 населения [147]. Столь большая разница в оценке масштабов циркуляции полиовирусов, по-видимому, обусловлена использованием авторами разных методик расчета. Для НПЭВ подобные расчеты не проводились и, скорее всего, являются нереальными. Таким образом, оценку масштабов циркуляции НПЭВ представляется возможным осуществить только в результате исследования на предмет вирусоносительства проб фекалий от практически здоровых лиц.

Следует отметить, что многолетние санитарно-вирусологические исследования сточных вод на наличие НПЭВ внесли существенный вклад в развитие эпидемиологии ЭВИ и позволили установить следующие факты:

- обнаружение НПЭВ в сточных водах является индикатором их циркуляции среди здорового населения;

- в пробах сточных вод крупных населенных пунктов НПЭВ обнаруживаются круглогодично;
- частота обнаружения НПЭВ в пробах сточных вод возрастает в летне-осенний период;
- частота выявления и типовой состав НПЭВ, обнаруживаемых в сточной воде населенного пункта, могут существенно меняться в течение года;
- с помощью вирусологического метода в сточной воде чаще других НПЭВ обнаруживаются вирусы Коксаки группы В;
- часть серотипов НПЭВ, обнаруживаемых в сточных водах, удается выявить в фекальном материале и ликворе больных ЭВИ;
- эпидемически значимый серотип НПЭВ можно обнаружить в пробах сточной воды, взятых за месяц до начала подъема заболеваемости ЭВИ;
- серотип НПЭВ, вызвавший эпидемический подъем заболеваемости ЭВИ в определенном населенном пункте, может обнаруживаться в сточной воде в течение нескольких следующих лет;
- большинство серотипов НПЭВ, попадающих в сточные воды с фекалиями вирусоносителей, относятся к плохо культивируемым и некультивируемым, и поэтому не выявляются при использовании вирусологического метода исследования;
- с помощью метода ПЦР наличие НПЭВ в пробах сточных вод удается обнаружить в большем проценте случаев, по сравнению с вирусологическим методом;
- молекулярно-генетическое типирование НПЭВ непосредственно в образцах сточных вод является неэффективным вследствие контаминации проб одновременно несколькими серотипами вирусов.

- результаты вирусологического исследования сточных вод не могут быть использованы для оценки истинных масштабов циркуляции НПЭВ среди населения.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что санитарно-вирусологические исследования сточных вод имеют решающее значение для доказательства наличия или отсутствия скрытой циркуляции «диких» штаммов полиовирусов как при оценке эпидемиологической ситуации по полиомиелиту, так и для сертификации территории как «свободной от полиомиелита».

Однако результативность и информативность «попутного» обнаружения НПЭВ в пробах сточных вод относительно невысока, так как дает лишь весьма приблизительную картину интенсивности их циркуляции 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 [65, 66, 171, 190]. 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 [181].

Перечисленные выше моменты убедительно свидетельствуют в пользу необходимости получения дополнительной информации о масштабах и спектре серотипов НПЭВ, циркулирующих среди населения для совершенствования эпидемиологического надзора за ЭВИ в плане повышения достоверности оценки эпидситуации и составления эпидемиологического прогноза. Данная информация может быть получена только в результате исследования на предмет вирусносительства проб фекалий от практически здоровых лиц.

## **1.2 Индикация энтеровирусов в пробах фекалий лиц с бессимптомной формой инфекции**

Известно, что около 85% случаев ЭВИ протекает бессимптомно, около 12-14% случаев имеют клинику легкого лихорадочного заболевания и только в 1-3 процентах случаев возникает средне-тяжелая или тяжелая форма заболевания [1, 52, 122, 123, 124, 178]. Актуальность изучения распространенности бессимптомного носительства энтеровирусов среди населения исторически была связана с проблемой борьбы с полиомиелитом.

Вопросу изучения циркуляции НПЭВ среди здорового населения путем обнаружения ЭВ в пробах фекалий лиц с бессимптомной формой инфекции посвящено большое число работ, выполненных в нашей стране и за рубежом. Первые масштабные исследования «здорового» носительства НПЭВ в Советском Союзе были проведены в конце 50-х - начале 60-х годов XX века [70, 93]. В результате проведенных исследований были установлены следующие факты:

- наиболее часто НПЭВ обнаруживаются в пробах фекалий от практически здоровых детей в возрасте до 6 лет;
- частота вирусносительства в коллективах детских дошкольных учреждений составляет, в среднем, 10%;

- пиковые значения частоты вирусоносительства среди детей наблюдаются в летне-осенний период;
- среди выделенных штаммов вирусы Коксаки В и ЕСНО обнаруживаются, примерно, в равных пропорциях;
- продолжительность носительства составляет от 2-х до 15 дней;
- лица, освободившиеся от носительства одного серотипа, через определенное время могут быть инфицированы другим серотипом НПЭВ;
- в разные годы происходит изменение пейзажа серотипов, циркулирующих в детском коллективе и смена доминирующих серотипов НПЭВ.

Работы по изучению вирусоносительства НПЭВ у практически здоровых лиц можно сгруппировать следующим образом:

- выделение НПЭВ от здоровых детей в зависимости от возраста, особенностей вскармливания и времени года;
- вирусоносительство у детей из организованных коллективов;
- частота вирусоносительства в различных возрастных группах населения;
- частота вирусоносительства и спектр НПЭВ у детей в период сезонных подъемов заболеваемости ЭВИ.

В особую группу можно выделить работы, в которых проводится сравнительный анализ частоты обнаружения и спектра НПЭВ, выделенных от больных острой кишечной инфекцией и от практически здоровых детей [97].

В работах, опубликованных в последующие годы XX века и в начале XXI века, результаты исследования "здорового" вирусоносительства НПЭВ в большинстве случаев повторяли полученные ранее данные и ограничивались констатацией фактов обнаружения и описанием спектра выявленных серотипов. Было отмечено, что спектр серотипов НПЭВ, выделенных из проб фекалий

здоровых лиц, значительно шире спектра, обнаруживаемого в сточной воде [36].

В 1971 г. вышли в свет методические указания «Лабораторная диагностика спорадических серозных менингитов, вызываемых энтеровирусами» [189], в которых была представлена рабочая схема для интерпретации результатов специфической лабораторной диагностики случаев серозного менингита. Наряду с лицами, контактировавшими с больными, авторы предлагали исследовать наличие энтеровирусов в фекальном материале от двух групп сравнения, которые отбирались среди пациентов соматических отделений больниц и из числа здоровых детей, первично поступающих в ясельные группы в конце третьего квартала. Количество обследуемых детей из групп сравнения не уточнялось.

Для анализа и оценки результатов лабораторной диагностики случаев серозного менингита, подозрительных по клинической картине на энтеровирусную природу, предлагалось в дополнение к результатам серовирусологических исследований образцов крови и фекалий, полученных от больных, сопоставлять частоту выделения того или иного серотипа у лиц в группах сравнения. По мнению авторов, «...статистически подтвержденная более высокая выделяемость вируса больными позволяет с полной достоверностью включить его в число возбудителей спорадических серозных менингитов» [40]. Из этого следует, что в рассматриваемых методических указаниях предлагалось использовать результаты вирусологического исследования фекалий от практически здоровых детей и от пациентов с неинфекционной патологией с диагностическими целями.

В 1987 г. были изданы Методические рекомендации «Организация эпиднадзора и методы лабораторной диагностики полиомиелита и других энтеровирусных инфекций», в которых впервые предлагалось включить в перечень мероприятий эпидемиологического надзора

плановые обследования на вирусоносительство НПЭВ практически здоровых детей [14]. В разделе «Контроль за циркуляцией энтеровирусов среди населения и во внешней среде» цель и задачи исследования сформулированы следующим образом: «Для определения удельного веса вирусоносителей среди здоровых детей и характеристики типового фона циркулирующих на определенной территории энтеровирусов эпидемиологи *обязаны* (!) организовать силами лечпрофучреждений сбор фекалий не менее чем у 200 лиц в возрасте от 1 до 7 лет. При этом особое внимание должно быть обращено на обследование детей от 1 года до 3 лет» [14]. Контингенты обследуемых рекомендовалось формировать из неорганизованных детей, оформляющихся в детские дошкольные учреждения или в 1-й класс школы. Контроль за циркуляцией энтеровирусов среди здоровых детей рекомендовалось проводить либо ежеквартально, либо 2 раза в год: в марте-апреле и в августе-сентябре (по 100 проб). Обязательным условием при формировании контингента являлось отсутствие у ребенка контакта с больным энтеровирусной инфекцией, а также соблюдение не менее чем 2-х месячного интервала с момента последней прививки ЖВС.

В разделе «Оценка и интерпретация результатов лабораторных исследований» в отношении данных, полученных при наблюдении за носительством энтеровирусов среди здоровых детей, были сделаны следующие выводы [14]:

«1) Выявление циркуляции ранее не встречавшегося на территории населенного пункта или области энтеровируса позволяет рассматривать его как потенциальный этиологический фактор эпидемического подъема заболеваемости;

2) Повышение уровня выделяемости полиовирусов от здоровых детей должно расцениваться как показатель ухудшения эпидобстановки по полиомиелиту;



3) Более высокая выделяемость какого-либо серотипа от больных, по сравнению со здоровыми, является свидетельством его причастности к возникновению спорадических случаев на данной территории;

4) Многолетнее изучение циркуляции энтеровирусов позволяет прогнозировать возможность эпидемического подъема заболеваемости серозным менингитом или возникновения вспышек ЭВИ, особенно в детских коллективах».

Если с первыми двумя выводами можно безоговорочно согласиться, то следующие два вызывают вопросы с точки зрения их практического значения. Так, получение вирусологического и серологического подтверждения этиологического диагноза ЭВИ само по себе есть «свидетельство его причастности к возникновению спорадических случаев на данной территории» независимо от частоты обнаружения этого серотипа у здоровых лиц.

В отношении прогноза заболеваемости ЭВИ на основании изучения циркуляции НПЭВ среди здорового детского населения, авторы не дают конкретных указаний по методике расчетов, на основании которых можно составить такой прогноз. Фактически, полученные результаты могли быть использованы только для ретроспективного эпидемиологического анализа.

Примечательно, что авторы Методических рекомендаций в исследовании циркуляции НПЭВ отдают приоритет получению и интерпретации результатов по частоте и спектру вирусоносительства у детей, в то время, как санитарно-вирусологическим исследованиям отводится вспомогательная роль. Так, в п. 3.6. раздела «Контроль за циркуляцией энтеровирусов среди населения и во внешней среде» сказано: «Для выявления наиболее широко циркулирующих типов энтеровирусов в данной местности *можно рекомендовать* исследование проб сточных вод» [14].

В целом, по нашему мнению, издание названных Методических рекомендаций явилось шагом вперед в области совершенствования системы эпидемиологического надзора за неполиомиелитными вирусными инфекциями, поскольку авторами была сделана попытка расширения информационного поля для анализа особенностей эпидемиологического процесса путем мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения. Однако, следует отметить, что предложение о включении мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения в систему эпиднадзора не было реализовано даже в учреждении, где были разработаны Методические рекомендации (Свердловский НИИ вирусных инфекций) из-за большой трудоемкости вирусологического метода и малой информативности получаемых результатов.

Разработка молекулярно-генетических методов индикации и идентификации энтеровирусов открыла новые перспективы в области совершенствования системы эпидемиологического надзора за ЭВИ. В 2005 г. были утверждены Методические указания "Санитарно-вирусологический контроль водных объектов", в которых впервые, наряду с вирусологическим методом исследования, для индикации энтеровирусов предусматривалось использование ОТ-ПЦР [54, 62].

В 2006 г. были утверждены Методические указания "Энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика" [52], где в разделе "Молекулярно-биологические методы диагностики энтеровирусных инфекций" излагались общие сведения о принципах и достоинствах молекулярно-генетических методов индикации (ОТ-ПЦР) и идентификации НПЭВ (секвенирование участка генома) со ссылкой на МУК 4.2.2019-05 "Санитарно-вирусологический контроль водных объектов". В п. 4.5 названных Указаний в качестве одного из направлений эпидемиологического надзора за ЭВИ фигурирует "слежение за

циркуляцией энтеровирусов среди населения и в объектах окружающей среды (вода, продукты питания)", однако не уточняется, о какой возрастной группе населения идет речь, каким должен быть объем выборки и в какое время года необходимо проводить отбор проб.

В следующей редакции Методических указаний «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции», утвержденных в 2008 г. [30, 53], мониторинга интенсивности вирусоносительства у здорового населения не упоминается, а предписывается «...наблюдение за циркуляцией энтеровирусов, включая результаты исследования проб из объектов окружающей среды и материала от больных» (п.4.3.).

Санитарные Правила 2011 г. (СП 3.1.2950-11) "Профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции" в разделе VII «Организация государственного санитарно-эпидемиологического надзора за энтеровирусной инфекцией» содержат следующее определение задач надзора:

«Государственный санитарно-эпидемиологический надзор за ЭВИ включает мониторинг за заболеваемостью населения ЭВИ и носительством энтеровирусов, включая анализ по территориям;...» (п.7.2.), однако без конкретизации возрастного состава контингента здорового населения, величины выборки и периодичности, используемых методов исследования.

Приведенные выдержки из опубликованных ранее и ныне действующих нормативно-методических документов свидетельствуют, с одной стороны, о важности получения оперативной информации о масштабах «здорового» вирусоносительства и типовом составе НПЭВ, циркулирующих на определенной территории, для осуществления эпидемиологического надзора за ЭВИ, с другой стороны, - о недостаточном опыте организации, проведения и интерпретации результатов подобных исследований.

Работы последних лет по изучению циркуляции НПЭВ на территории Российской Федерации с использованием молекулярно-генетических методов индикации и идентификации НПЭВ в основном были посвящены сравнительному анализу частоты выявления возбудителей в пробах фекалий у детей из организованных коллективов, у обслуживающего персонала детских учреждений в период повышенной заболеваемости ЭВИ, определению спектра серотипов у «здоровых» вирусоносителей и у больных острой кишечной инфекцией [2, 22, 42, 62, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104].

Существенной новизной проведенных исследований [95, 98, 101] явилось получение данных о преимущественной циркуляции среди здорового населения некультивируемых и плохо культивируемых вирусов Коксаки группы А, частота встречаемости которых у вирусоносителей достигала 60% среди прочих обнаруживаемых представителей НПЭВ. Результаты, полученные при обследовании детей с острой кишечной инфекцией на наличие НПЭВ, по мнению авторов [95, 98, 101, 168], могли свидетельствовать о целесообразности включения обследования данной группы больных в систему мероприятий по эпидемиологическому надзору за ЭВИ в качестве показателя интенсивности циркуляции НПЭВ среди населения [104], однако обоснованность выбора больных с острой кишечной инфекцией в качестве индикаторной группы обследуемых представляется спорной.

Проведенный анализ данных литературы, посвященной исследованиям циркуляции НПЭВ среди здорового населения, позволяет сделать следующие выводы:

-наиболее полную объективную информацию о масштабах распространенности НПЭВ в популяции и о спектре циркулирующих серотипов можно получить только с помощью исследования вирусоносительства среди практически здоровых лиц;

-молекулярно-генетические методы индикации и идентификации НПЭВ позволяют осуществлять мониторинг циркуляции НПЭВ и получать дополнительную оперативную информацию для оценки и прогноза развития эпидемиологической ситуации по заболеваемости ЭВИ, что будет способствовать совершенствованию системы эпидемиологического надзора;

-для обоснования включения мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения в систему эпидемиологического надзора за ЭВИ необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на выяснение вопросов о связи роста заболеваемости ЭВИ с интенсивностью циркуляции НПЭВ среди населения, о соотношении частоты выявления циркулирующих серотипов с частотой их встречаемости в качестве этиологических агентов ЭВИ, а также о критериях оценки вирулентности и эпидемиологической опасности циркулирующих штаммов.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

На предмет обнаружения РНК НПЭВ было исследовано 2906 проб биологического материала (фекалии, ликвор, носоглоточный смыв), полученных от больных ЭВИ и лиц с бессимптомной формой инфекции, проживающих на территории г. Екатеринбурга, городов Свердловской, Пермской, Тюменской, Курганской, Челябинской областей (таблица 2.1, 2.2).

Таблица 2.1

#### Количество жителей г.Екатеринбурга, обследованных на наличие в биологическом материале энтеровирусов

Группа обследованных	Исследуемый материал	Возрастная группа, количество обследованных		
		до 17 лет	старше 17 лет	Всего
Клинически здоровые	Фекалии	2391	0	2391
Больные с диагнозом "Энтеровирусный менингит"	Ликвор	269	89	358
Больные ЭВИ, ОВП, контакт	Фекалии	6	6	12
Итого		2666	95	2761

**Количество обследованных, проживающих на территории  
Свердловской области и сопредельных областей на наличие в  
биологическом материале энтеровирусов**

Территория	Населенный пункт	Количество обследованных	Всего
Свердловская обл.	Алапаевск	8	93
	Байкалово	2	
	Березовский	9	
	В. Сысерть	1	
	Верхотурье	2	
	Ирбит	2	
	К. Уральский	1	
	Кауровка	1	
	Краснотуринск	5	
	Красноуфимск	1	
	Н. Тагил	12	
	Новоуткинск	1	
	П. Сарапулка	11	
	Первоуральск	21	
	Полевской	2	
	Реж	2	
	Сатка	1	
	Серов	3	
	Среднеуральск	4	

	Сухой лог	1	
	Сысерть	2	
	Тавда	1	
Челябинская обл.	Челябинск	23	23
Курганская обл.	Курган	10	10
Тюменская обл.	Тюмень	17	17
Пермская обл.	Пермь	1	2
	Киров	1	
Всего			145

С целью индикации, идентификации и филогенетического анализа НПЭВ проведено 3807 исследований (табл.2.3).

Таблица 2.3

### Количество проведенных исследований

Исследуемый материал	Вид исследования			Всего
	Индикация НПЭВ	Генотипирование	Филогенетический анализ	
Фекалии	2497	124	17	2638
Ликвор	421	342	235	998
Носоглоточный смыв	22	6	1	29
Культуральная жидкость	61	54	27	142
Всего	3001	526	280	3807



## 2.2 Методы

### **Индикация энтеровирусов в биологическом материале методом ОТ-ПЦР**

Суммарную ДНК\РНК выделяли из 100 мкл исследуемого материала (экстракт фекалий, спинномозговая жидкость) 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 участка энтеровирусной кДНК проводили с помощью набора реагентов "АmplиСенс 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.

#### **Идентификация выделенных энтеровирусов.**

Идентификацию обнаруженных энтеровирусов проводили по нуклеотидным последовательностям двух участков генома: кодирующих белки VP4 и часть VP2 [115] и область 3' конца белка VP1 [121]. Основанием для такого выбора послужил собственный опыт,

свидетельствующий о достаточно низкой чувствительности ПЦР с праймерами к участкам, кодирующим VP1, в результате чего не удавалось генотипировать энтеровирусы, присутствующие в образцах первичного материала в низких концентрациях. Чувствительность ПЦР с праймерами, фланкирующими последовательность, кодирующую весь белок VP4 и часть VP2, была намного выше за счет локализации 5'-праймера в высококонсервативной нетранслируемой части генома, поэтому у более, чем половины исследованных штаммов, серотип был определен по последовательности, кодирующей VP2-VP4.

Несмотря на то, что эффективность генотипирования как по одному, так и по другому участку генома была одинаковой, предпочтительней для дальнейшего филогенетического анализа и определения геноварианта штамма являлась последовательность, кодирующая VP1, поскольку подавляющее большинство нуклеотидных последовательностей энтеровирусов, депонированных в международном банке генетической информации GenBank NCBI, представлено именно этой областью вирусного генома.

### **Амплификация участков генома, кодирующих белки VP4-VP2 и VP1**

Амплификацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белки VP2-VP4 проводили по ранее описанной методике с помощью полугнездной ПЦР [115]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 2.4

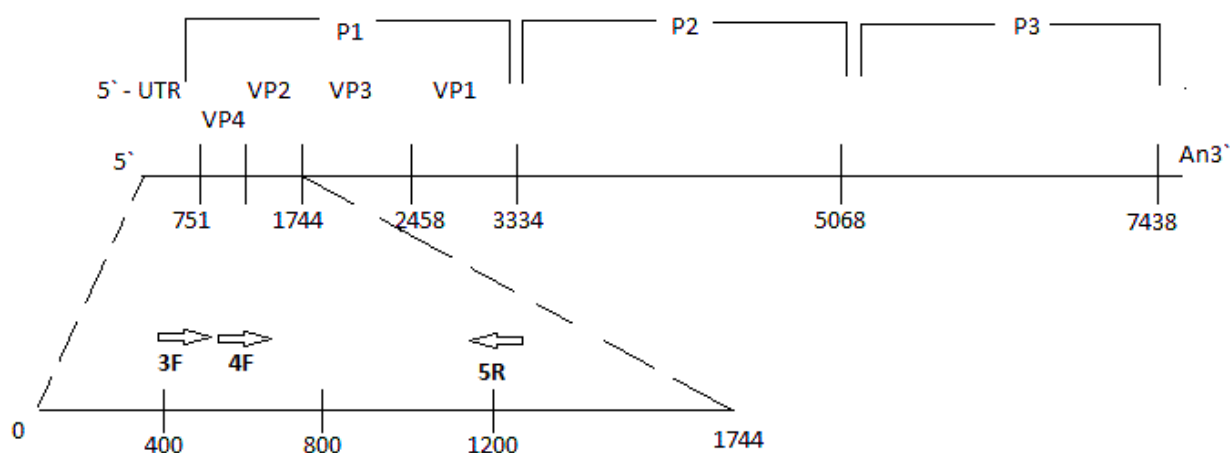
Таблица 2.4

### **Нуклеотидная последовательность праймеров\* для идентификации энтеровирусов по участку генома, кодирующему белки VP2-VP4**

Обозначение	Нуклеотидная последовательность	Позиция	п оснований
3F(прямой)	5'- TCCTCCGGCCCCTGAATG -3'	449-466	18
4F(прямой)	5'- TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC -3'	548 - 568	21
5R(обратный)	5'- GGCAACTTCCACCACCC -3'	1206- 1187	20

\* Синтез указанных в таблице и упоминаемых в дальнейшем праймеров выполнен в ЗАО "Синтол" (Москва).

На рисунке 2.1 показаны позиции нуклеотидных последовательностей, использованных авторами в качестве праймеров на карте генома прототипного штамма вируса ЕСНО11[115].



**Рисунок 2.1. Позиции и полярность праймеров в полугнездной ПЦР для амплификации участка генома вируса ЕСНО11, кодирующего белок VP2 (цит. по Arola et al.[115]).**

Для проведения первого раунда ПЦР готовили 25  $\mu$ l 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-НСl (рН 8,3), 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>), 10 мкл кДНК.

**Первый раунд ПЦР проводили в следующем режиме:**

Температура, °С	Экспозиция	Количество циклов
95,0	3 мин	1
95,0	20 сек	42
55,0	1,5 мин	
72,0	40 сек	
72,0	3 мин	1

Во втором раунде полугнездной ПЦР использовали аналогичную реакцию смесь с праймерами 4F и 5R, и 1 мкл продукта первого раунда (757 пар нуклеотидов).

**Режим проведения второго раунда:**

Температура, °С	Экспозиция	Количество циклов
95,0	3 мин	1
95,0	20 сек	35
60,0	30 сек	
72,0	30 сек	
72,0	3 мин	1

Длина продукта второго раунда - 658 пар нуклеотидов.

Аmplификацию участка генома, кодирующего часть белка VP1 проводили с помощью гнездной ПЦР [121]. Последовательность олигонуклеотидных праймеров представлена в таблице 2.5

Таблица 2.5

**Нуклеотидная последовательность праймеров для  
идентификации энтеровирусов по участку генома, кодирующему  
белок VP1**

Обозначение	Нуклеотидная последовательность	Позиция	п оснований
1S (прямой)	5'- GGTTYGAYITGGARITACITTYGT -3'	2764- 2809	45
1A (обратный)	5'-TGIGAYTGRTAYCTIKYKGGRTARTA -3'	3612- 3637	25
2S (прямой)	5'- ARWTWATGTAYRTICCCICGIG -3'	2874- 2898	24
2A (обратный)	5'- CCIGTKKWRCAYKRCAYCTIGC -3'	3507- 3529	22

Для проведения первого раунда ПЦР готовили 25 µl реакционной смеси, включавшей: 2 ед. ДНК-полимеразы, 0,2 мМ смесь dNTP, по 5 пмоль праймеров 1S и 1A, реакционный буфер (67 мМ Трис-НСl, рН 8,3; 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>), 10 мкл кДНК.

**Первый раунд ПЦР проводили по следующей программе:**

Температура, °С	Экспозиция	Количество циклов
95,0	3 мин	1
95,0	20 сек	42
50,0	3 мин	
72,0	30 сек	
72,0	3 мин	1

Во втором раунде полугнездной ПЦР использовали аналогичную реакционную смесь с праймерами 2S, 2A и 1 мкл продукта первой амплификации (873 пар нуклеотидов)

**Второй раунд ПЦР проводили по следующей программе:**

Температура, °С	Экспозиция	Количество циклов
95,0	3 мин	1
95,0	20 сек	35
52,0	30 сек	
72,0	30 сек	
72,0	3 мин	1

Длина продукта амплификации - 655 пар нуклеотидов.

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

**Прямое секвенирование структурной части генома энтеровирусов**

Секвенирование фрагментов ДНК проводили по методу Сенгера [144, 174, 177] 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 [182].

### **Молекулярно-генетическое типирование энтеровирусов**

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.

### **Построение филограмм**

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 филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореplik. 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  $\chi^2$ .

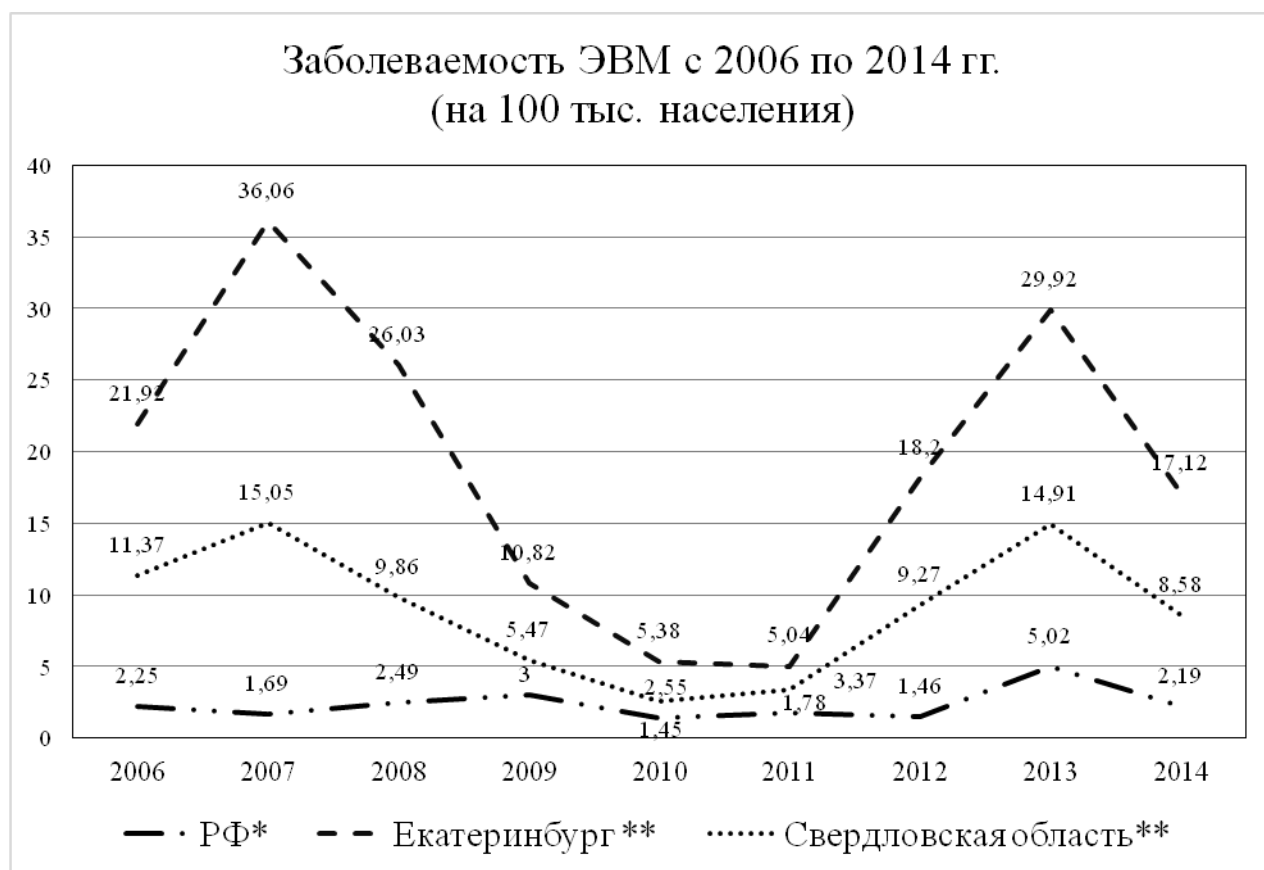
Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости населения г. Екатеринбурга и Свердловской области ЭВМ в 2006-2014 гг.



### Глава 3. Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у больных асептическим менингитом и у детей с бессимптомной формой инфекции

#### 3.1. Спектр серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных в ликворе больных энтеровирусным менингитом в период наблюдения с 2008 по 2014 гг.

Ежегодные и средние многолетние уровни показателя заболеваемости ЭВМ в г. Екатеринбурге и Свердловской области многократно превышают значения аналогичных показателей по Российской Федерации [59, 81], и этому факту до настоящего времени нет достаточно убедительного объяснения (рис.3.1).



**Рисунок 3.1. Ежегодные значения показателей заболеваемости энтеровирусным менингитом по Российской Федерации, Свердловской области и г. Екатеринбургу (на 100 тыс. населения).**

\*По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году» [59].

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

В период с 2006 г. по 2014 г. в г. Екатеринбурге и области было отмечено два пика повышения показателей заболеваемости ЭВМ – в 2007 г. и 2013 г., причем, заболеваемость в г. Екатеринбурге превышала областные показатели приблизительно в 2 раза. Этиологическая диагностика ЭВМ с использованием молекулярных методов индикации (ОТ-ПЦР) и идентификации (секвенирования) осуществлялась с 2008 г. по 2014 г. Параллельный мониторинг спектра и частоты выявления различных серотипов НПЭВ у больных ЭВМ и клинически здоровых лиц проводился с 2011 г. по 2014 г.

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). В 55 пробах концентрация вируса, по-видимому, была недостаточной для успешной амплификации последовательностей при подготовке к секвенированию. Спектр обнаруженных серотипов НПЭВ представлен в таблице 3.1.

Таблица 3.1

**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.

Из 366 идентифицированных штаммов подавляющее большинство (73%) было представлено вирусами ЕСНО, что согласуется с данными литературы о преобладании вирусов этой группы в этиологической структуре ЭВМ [43, 90, 119, 120, 156, 180]. Среди вирусов группы

ЕСНО ведущая роль принадлежала вирусам ЕСНО6 и ЕСНО30, доля каждого из которых составила 30,1 и 39,9%, соответственно, от количества обнаруженных в этой группе штаммов, а суммарная доля двух указанных серотипов среди всех идентифицированных штаммов равнялась 51,9%(табл.3.2).

Таблица 3.2

**Количество штаммов различных серотипов  
неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от больных  
энтеровирусным менингитом**

Группа вирусов	Количество серотипов	Количество штаммов	Серотип	Количество штаммов
Коксаки А	1	51 (13,9%)	СА9	51
Коксаки В	5	47 (12,9%)	СВ1	9
			СВ2	11
			СВ3	3
			СВ4	5
			СВ5	19
ЕСНО	11	268 (73%)	Е2	1
			Е5	5
			Е6	83
			Е7	20
			Е9	9
			Е11	4
			Е14	5
			Е17	3
			Е18	29
			Е25	2
Е30	107			
EV	1	1 (0,2%)	EV97	1
Всего	18	366		366

Следующими по частоте выявления в ликворе больных ЭВМ были вирусы Коксаки А9 и ЕСНО18, обнаруженные в 13,9% и 7,9% случаев,

соответственно. Большинство идентифицированных штаммов обнаруживалось относительно редко, нерегулярно или эпизодически.

Полученные результаты позволили сгруппировать НПЭВ, ассоциированные с заболеванием ЭВМ, следующим образом:

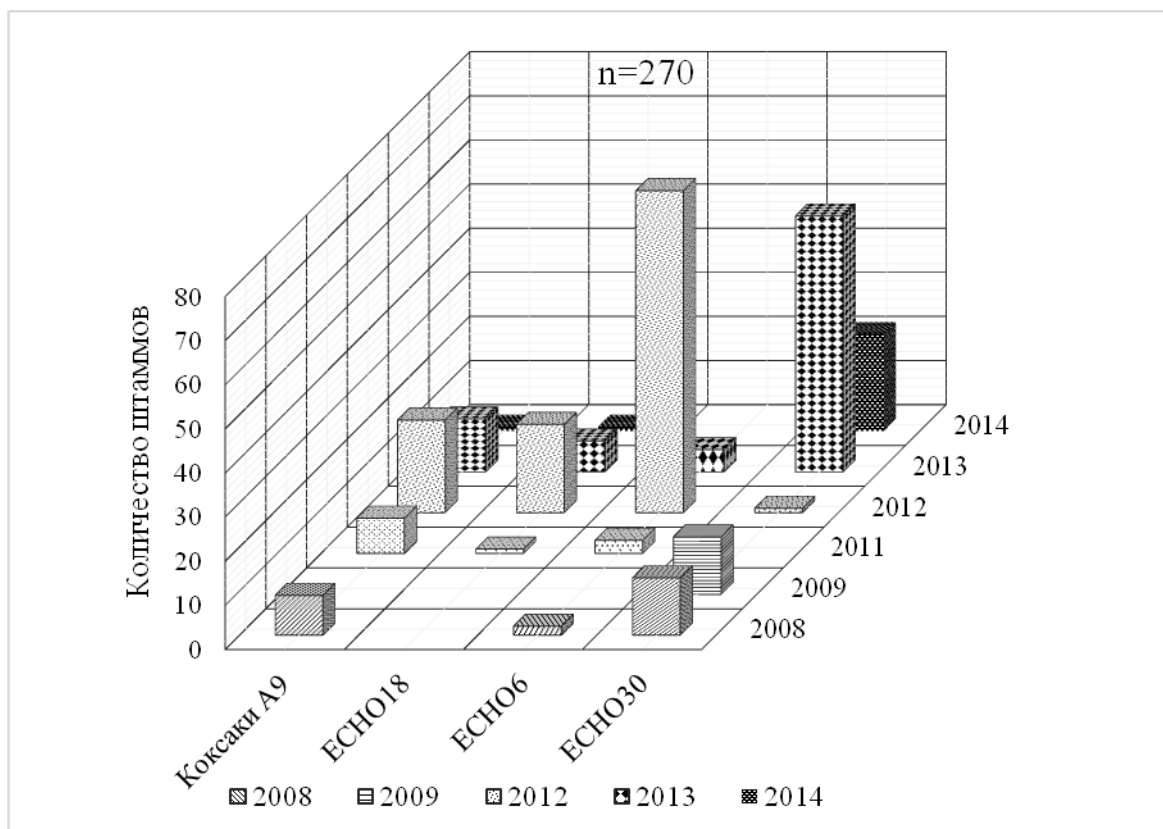
1) Серотипы с наиболее высокой частотой обнаружения, преобладавшие за весь период наблюдения - ЕСНО6, 30 (51,9% обнаруженных штаммов);

2) Серотипы с регулярно выявлявшиеся в периоде наблюдения на протяжении нескольких лет обнаружения, циркуляция которых прослеживается на протяжении нескольких лет как в периоды повышения уровня заболеваемости, так и в периоды относительного эпидемического благополучия - Коксаки А9, ЕСНО18 (21,9% обнаруженных штаммов);

3) Серотипы, обнаруживаемые эпизодически (Коксаки В1, В2, В3, В4, В5; ЕСНО2, 5,7, 9, 11, 14, 17, 25, EV97).

Таким образом, группу возбудителей, вызывавших более 70% случаев ЭВМ в г.Екатеринбурге в период 6-летнего наблюдения образует 4 серотипа НПЭВ: КоксакиА9 и ЕСНО 6, 18, 30.

На рисунке 3.2 представлено количество основных этиологических агентов ЭВМ, обнаруженных в ликворе больных по каждому году в течение периода наблюдения.

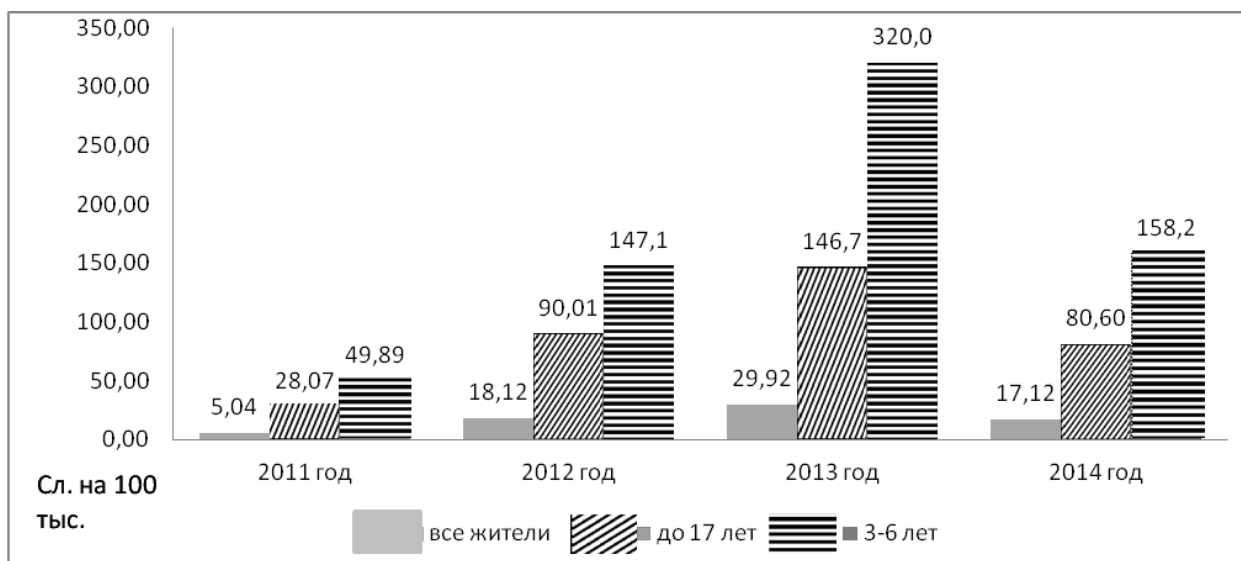


**Рисунок 3.2. Распределение по годам количества основных этиологических агентов энтеровирусного менингита, обнаруженных в ликворе больных.**

Из представленных на рисунке данных следует, что в 2012 г., когда наблюдалось начало подъема заболеваемости (18,2 на 100тыс.), доминирующим этиологическим агентом ЭВМ являлся вирус ЕСНО6, который был обнаружен в ликворе у 40% пациентов. В следующем 2013 г. на фоне дальнейшего повышения заболеваемости (29,92 на 100 тыс.) произошла смена доминирующего серотипа: в 58,5% случаев у пациентов обнаруживался вирус ЕСНО 30. Этот серотип оставался доминирующим этиологическим агентом ЭВМ (обнаруживался в 50% случаев) и в 2014 г., когда уровень заболеваемости снизился в 2 раза.

В связи с тем, что в группу обследованных входили дети разного возраста, представлялось целесообразным провести сравнительный анализ частоты обнаружения основных возбудителей у больных

дошкольного и школьного возраста. На рисунке 3.3 представлены значения показателей заболеваемости ЭВМ среди различных возрастных групп населения г. Екатеринбурга.

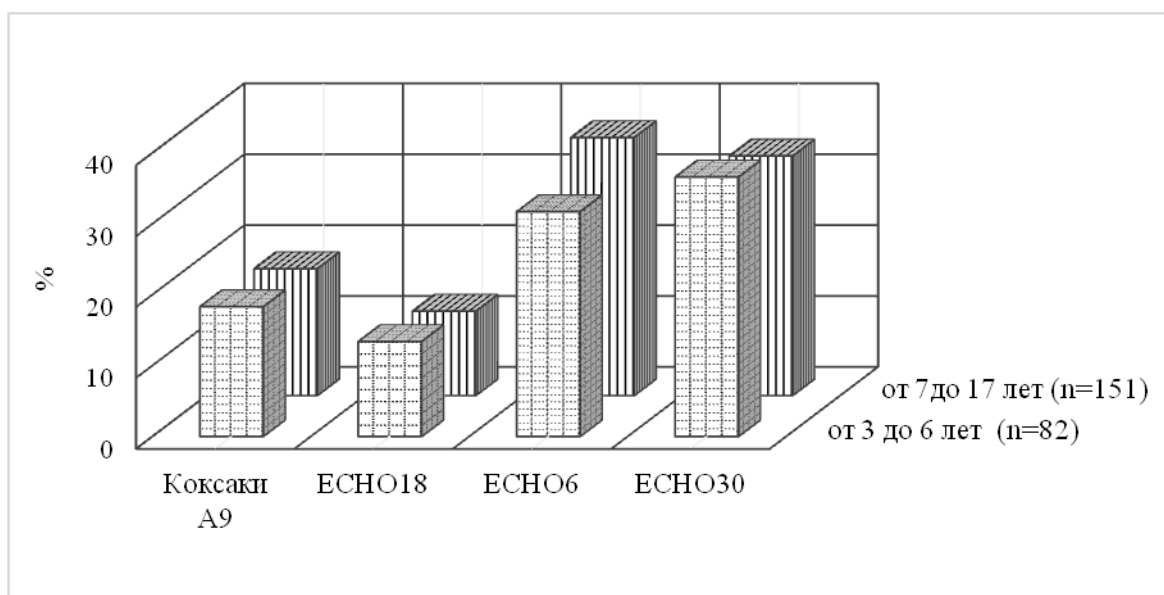


**Рисунок 3.3. Показатели заболеваемости энтеровирусным менингитом в различных возрастных группах населения г.Екатеринбурга в 2011-2014 гг. (на 100 тыс.)\***

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

Как видно из данных, представленных на рисунке 3.3, наиболее высокие показатели уровня заболеваемости наблюдались в возрастной группе детей 3-6 лет, что согласуется с данными литературы [92].

При сравнении частоты обнаружения основных этиологических агентов ЭВМ у детей дошкольного и школьного возрастов существенных различий не было выявлено (рис. 3.4).



**Рисунок 3.4. Частота обнаружения основных этиологических агентов энтеровирусного менингита у больных дошкольного и школьного возрастов.**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на существенные различия в уровне заболеваемости, по этиологической структуре возбудителей возрастные группы дошкольников и детей школьного возраста могут быть объединены в одну группу больных ЭВМ – «дети до 17 лет».

Полученные нами результаты по расшифровке этиологии ЭВМ на территории г. Екатеринбурга существенно дополняют литературные данные, поскольку молекулярно-генетическое типирование возбудителей, имеющих в клиническом материале, без их предварительного накопления позволяет избежать рестрикции, обусловленной клеточным тропизмом, и получить более полную информацию о спектре НПЭВ. В результате проведенных исследований было установлено, что в период с 2008 г. по 2014 г. в качестве этиологических агентов ЭВМ в г. Екатеринбурге фигурировало не менее 18 серотипов энтеровирусов, относящихся к виду В, в том числе, 7 серотипов, относящихся к некультивируемым или плохо



культивируемым (Коксаки А9, ЕСНО2,5,9,14,25, EV97). Высокая результативность генотипирования и достаточно большое количество идентифицированных штаммов НПЭВ, обнаруженных в ликворе больных ЭВМ позволили сделать заключение о полиэтиологичности ЭВМ в каждом эпидсезоне и выделить группу из четырех возбудителей (Коксаки А9,ЕСНО6,18,30), на долю которых в период наблюдения приходилось более 70% случаев заболевания ЭВМ.

Таким образом, расшифровка этиологической структуры инфекционных заболеваний, вызываемых НПЭВ, как одна из задач программы эпидемиологического надзора, может быть успешно решена путем широкого внедрения в практику вирусологических лабораторий современных методов молекулярно-генетического исследования. Однако решение основной задачи – прогнозирование развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ - остается весьма затруднительным без достаточно полного представления об интенсивности циркуляции и спектре циркулирующих серотипов НПЭВ на популяционном уровне.

Поскольку результаты вирусологического исследования сточных вод в этом отношении являются малоинформативными, единственным подходом к получению достоверной оперативной информации об особенностях развития эпидемического процесса, позволяющей приблизиться к решению вопроса прогнозирования уровня заболеваемости, является, по нашему мнению, мониторинг интенсивности циркуляции и спектра НПЭВ среди практически здорового населения.

### **3.2 Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у детей с бессимптомной формой инфекции**

Важным условием осуществления эффективного молекулярно-генетического мониторинга циркуляции является правильный выбор индикаторной возрастной группы населения.

Согласно данным литературы, наиболее активная циркуляция энтеровирусов наблюдается среди детского населения, особенно в возрастной группе от 0 до 3-х лет [85]. Однако существенную долю среди выделенных в этой группе детей вирусных агентов составляют вакцинные штаммы полиовирусов [16].

В настоящей работе за период наблюдения методом ПЦР на наличие энтеровирусов был исследован 2391 образец фекалий, полученных от клинически здоровых детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет (табл. 3.3).

Таблица 3.3

**Количество исследованных на наличие энтеровирусов образцов фекалий от клинически здоровых детей**

Год	Возраст			Всего
	До 3 лет	3-6 лет	7-17 лет	
2010	38	156	50	244
2011	92	237	63	387
2012	0	753	0	439
2013	0	630	0	630
2014	0	338	0	338
Всего	151	2114	126	2391

В 2010 году отбор проб осуществляли еженедельно с июня по сентябрь, в 2011г. – с мая по декабрь, с 2012г. по 2014г. - ежемесячно в течение всего года (по 40-50 проб в месяц).

На первом этапе исследования, 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 17 лет. Результаты индикации и генотипирования энтеровирусов представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4

**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 3.5

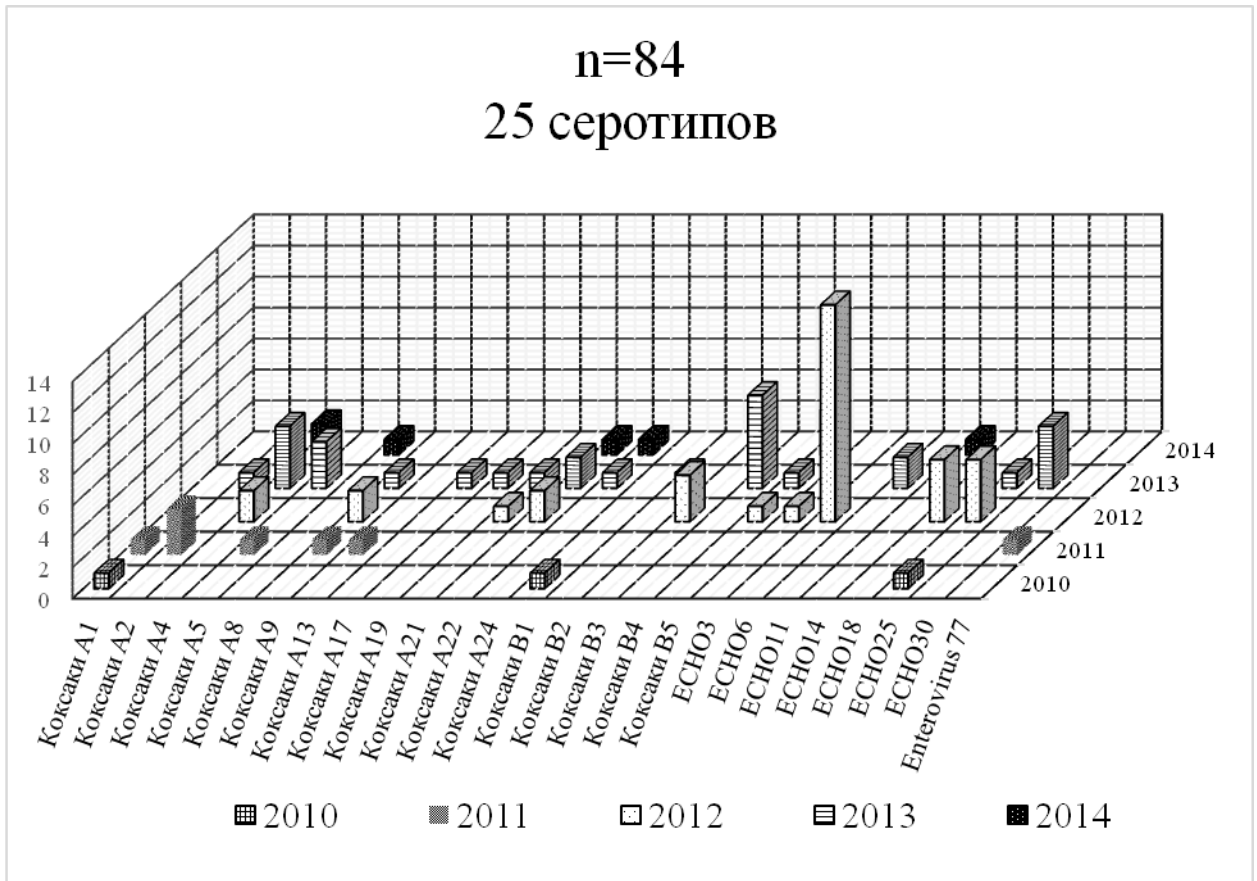
Таблица 3.5

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

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

Как видно из представленных данных, процент вирусовыделителей среди детей индикаторной группы из года в год менялся незначительно. При этом типовой состав обнаруженных возбудителей отличался разнообразием и претерпевал существенные изменения. Всего за период наблюдения была зафиксирована циркуляция 25 серотипов НПЭВ. В 2012 и 2013 гг., когда удалось типировать наибольшее количество штаммов, были выявлены 10 и 13 серотипов НПЭВ, соответственно. Следует отметить, что наибольшее разнообразие серотипов было выявлено среди вирусов Коксаки А (12 из 25 серотипов), которые ранее чрезвычайно редко удавалось обнаружить с помощью вирусологического метода исследования [36, 70].

Спектр серотипов НПЭВ и частота их обнаружения у детей индикаторной группы в период наблюдения представлены на рисунке 3.5.



**Рисунок 3.5. Спектр серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от детей с бессимптомной формой инфекции в возрасте 3-6 лет в период с 2010 по 2014 год.**

Примечательно, что ни один из идентифицированных НПЭВ не обнаруживался ежегодно на протяжении четырех и более лет. Только один из серотипов (Коксаки А9) был изолирован в течение трех лет подряд и 6 серотипов обнаруживались в течение двух лет подряд (Коксаки А1,4,21,22; Коксаки В3; ЕСНО25). Хотя полученные данные нельзя интерпретировать как свидетельство прекращения циркуляции того или иного серотипа на конкретной территории, тем не менее, они

отражают изменения интенсивности циркуляции отдельных серотипов, проявляющееся в изменении частоты их выявления от бессимптомных носителей.

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

Вышесказанное не означает, что полученные результаты отражают полную картину спектра НПЭВ, циркулирующих в популяции мегаполиса, однако есть все основания полагать, что в результате непрерывного пятилетнего мониторинга, в поле зрения оказалось большинство маловирулентных серотипов, которые определяют уровень кратковременного бессимптомного вирусоносительства.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что спектр серотипов НПЭВ, циркулирующих среди здорового населения, отличается большим разнообразием по сравнению с таковым, 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 имел 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.

## **Глава 4. Филогенетическая характеристика штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих в Свердловской области**

В настоящей главе представлен 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.

В задачи анализа по каждому серотипу входило выяснение следующих основных вопросов:

1) Определение филогенетических взаимоотношений штаммов, выделенных в разные годы на территории г. Екатеринбурга, Свердловской и сопредельных областей, а также в России и странах ближнего зарубежья;

2) Установление фактов одновременной циркуляции на территории г. Екатеринбурга штаммов различного происхождения;

3) Выяснение генетических взаимоотношений между штаммами, обнаруженными у больных ЭВМ и клинически здоровых лиц.

### **4.1. Филогенетический анализ штаммов вируса ЕСНО30 выделенных в 2007-2014гг.**

За прошедшие 10 лет вирус ЕСНО30 был доминирующим этиологическим агентом ЭВМ в г. Екатеринбурге в периоды эпидемического подъема уровня заболеваемости с четырехлетним

интервалом: в 2004 г., 2008-2009г.г. и 2013-2014 годах. В остальные годы периода наблюдения данный серотип обнаруживался эпизодически как у больных, так и у здоровых вирусовыделителей.

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 (табл. 4.1).

Таблица 4.1

**Количество штаммов вируса ЕСНО 30, использованных для построения филограмм**

Год	Область	Диагноз	Населенный пункт	Кол-во штаммов	VP1 GB No*	VP2 GB no
2007	Свердловская	ЭВИ	Екатеринбург	1	-	KP747538
			Первоуральск	2	KP842510 KP842511	-
			Заречный	1	-	-
			Березовский	1	-	-
			В. Пышма	1	-	-



2008	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	13	КР842518 КР842516 КР842515 КР842514	FJ752577 FJ796967 FJ796968 FJ796970 FJ796972 FJ796979 FJ796977 FJ796984 FJ796981 FJ796987 FJ796988 FJ796985 FJ796980				
						ЭВИ	Первоуральск	3	КР842517	GQ281596 GQ281593
							Алапаевск	1	-	GQ281601
	Челябинская		Озерск	1	-	-				
2009	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	16	-	КР747537				
	Челябинская		Челябинск	16	-	КР747544				
	Свердловская	ЭВИ	Екатеринбург	3	-	-				
	Челябинская		Челябинск	1	-	-				
	Тюменская		Тюмень	3	-	-				
2012	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	1	КР842512					
2013	Свердловская	ЭВИ	Н. Тагил	9	-	-				
			В. Сысерть	1	-	-				
		ЭВМ	Красноуринск	1	-	КР747540				
			Первоуральск	1	-	-				
			Красноуфимск	1	-	-				

			Екатеринбург	58	KP842508 KP842509	-
		Здоровый	Екатеринбург	3	-	KP747541
	Тюменская	Сточная вода	Тюмень	2	-	-
		ЭВМ		1	-	KP747543
	Курганская	ЭВМ	Курган	6	KP842513	KP747542
2014	Свердловская	ЭВИ	Алапаевск	2	-	-
			Краснотуринск	3	-	KP747539
		Контакт ЭВИ	Березовский	5	-	-
		ЭВМ	Березовский	2	-	-
			Екатеринбург	22	-	-
Итого			180	11	24	

\* NCBI GenBank Accession Number

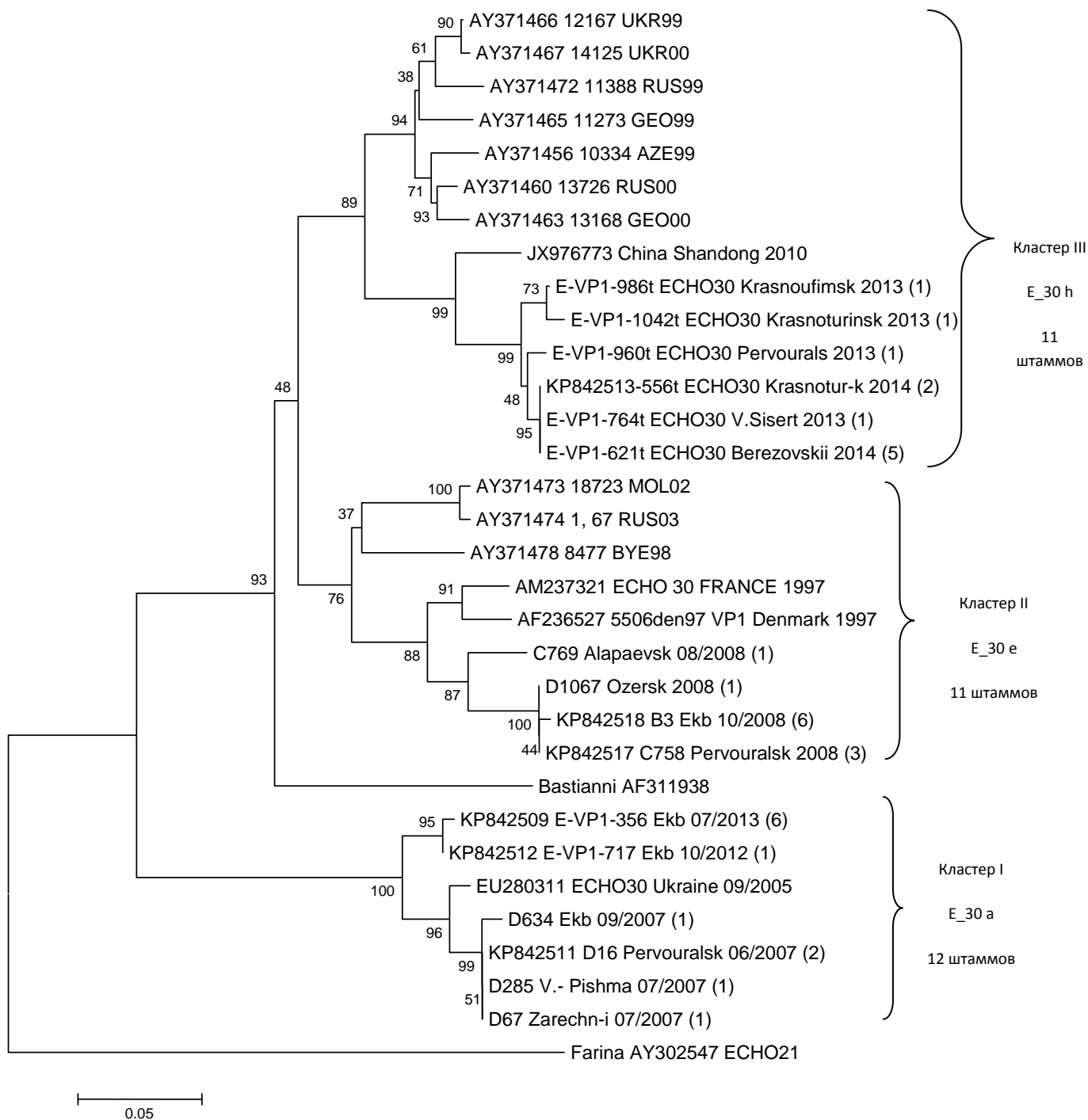
По 3'-участку последовательности, кодирующей белок VP1 (655 н.т.), проанализировано 34 штамма; по нуклеотидной последовательности, кодирующей белок VP4 и начальную часть VP2 (658 н.т.) - 176 штаммов (у 30 штаммов анализ проводился по двум участкам). В международной базе данных GenBank задепонировано 35 нуклеотидных последовательностей штаммов, в том числе: область VP1 – 11 последовательностей, VP4-VP2 – 24 последовательности.

Нуклеотидные последовательности исследованных штаммов выравнивали по соответствующим последовательностям прототипного штамма вируса ECHO30 Bastianni, прототипного штамма вируса ECHO21 Farina, как наиболее генетически близкого энтеровируса [188, 46, 118, 116], референтных штаммов, представленных в базе данных

GenBank и штаммов, изолированных в разные годы на территории России и стран ближнего зарубежья [46].

Принадлежность штаммов к тому или иному геноварианту вируса ЕСНО30 определяли по позициям нуклеотидов на участке генома, кодирующего белок VP1 [117, 121, 160].

На рисунке 4.1 представлены филогенетические взаимоотношения 34 штаммов вируса ЕСНО30, выделенных на территории г. Екатеринбурга, отражающие степень их генетического родства по 3'-участку генома, кодирующего белок VP1, с прототипным штаммом Bastianni, референтными штаммами из базы данных GenBank, а также со штаммами, обнаруженными в разные годы на территории Свердловской и сопредельных областей, России и стран ближнего зарубежья.



**Рисунок 4.1. Филограмма штаммов вируса ЕСНО30, выделенных в г. Екатеринбурге и на территории Уральского Федерального округа в период с 2007 по 2014 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующих белок VP1.**

\* - в скобках здесь и далее указано количество исследованных штаммов, нуклеотидные последовательности которых были идентичны представленному на филограмме штамму более чем на 99,8%

На полученной филограмме (Рис. 4.1) все исследованные штаммы группировались с прототипным штаммом Bastianni, что подтверждает их принадлежность к серотипу ЕСНО30. В филогенетическом древе можно выделить три кластера, объединяющих штаммы вируса ЕСНО30, относящиеся к геновариантам а, е и h (кластеры I, II и III, соответственно).

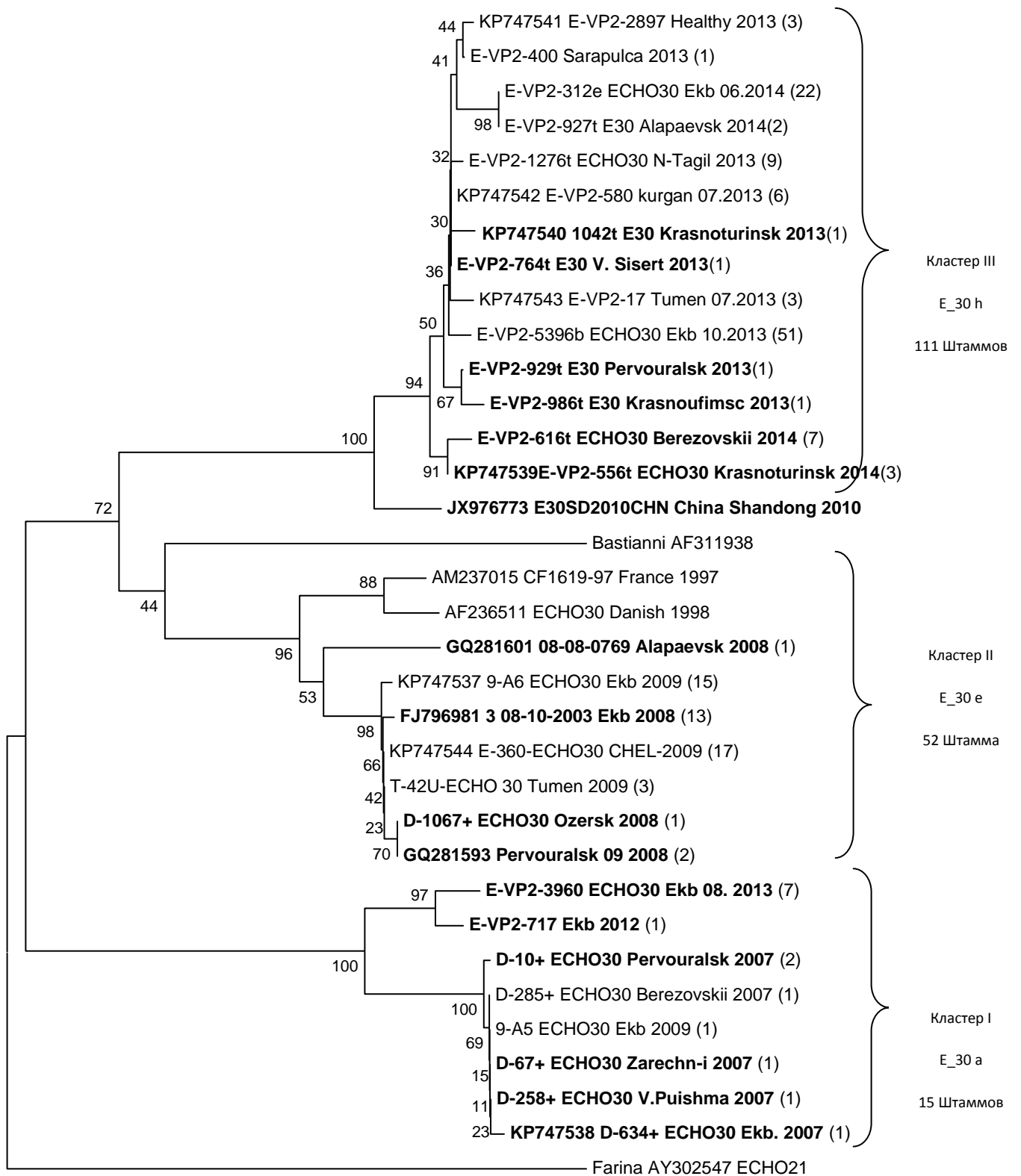
В кластере I (геновариант ЕСНО30\_a) группируются штаммы, выделенные в г. Екатеринбурге и в населенных пунктах Свердловской области в 2007 и 2012-2013 г.г., генетически близкие штамму EU28031, выделенному в 2005 г. на территории Украины.

Кластер II объединяет штаммы геноварианта ЕСНО30\_e, циркулировавшие в г. Екатеринбурге, Свердловской и Челябинской области в 2008г. и имеющие генетическое сходство со штаммами, изолированными в Западной Европе в 1997 г. и с описанными в литературе штаммами ЕСНО30\_e, выделенными в России, Молдавии и Белоруссии в 1998-2003 г.г. [148].

В кластере III большинство штаммов, изолированных на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области в 2013-2014 г. достоверно группируются с изолятом JX976773 E30SD2010 (Китай) геноварианта ЕСНО30\_h, но достоверно отличаются от штаммов, выделенных на территории России, Грузии, Азербайджана и Украины в 1999-2000 г.г. [148, 150].

Дополнительная информация о филогенетических связях штаммов вируса ЕСНО30, циркулировавших среди населения г. Екатеринбурга в 2007-2014 г.г. была получена в результате генетического анализа 176

последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки VP4-VP2  
(рис.4.2).



**Рисунок 4.2. Филограмма штаммов вируса ЕСНО30, выделенных в г. Екатеринбурге и на территории Уральского Федерального округа в период с 2007 по 2014 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующих белки VP4-VP2.**

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

Как видно из представленных данных, кластеризация штаммов, фигурирующих на филограмме рисунка 6.1, составленной по нуклеотидной последовательности, кодирующей VP1 (выделены полужирным шрифтом), не изменилась. Три кластера объединяют штаммы, относящиеся к геновариантам а, е и h.

Кластер I дополнился штаммом, изолированным от больного ЭВМ из г. Екатеринбурга в 2009 г., что является свидетельством продолжения циркуляции геноварианта «а» вируса ЕСНО30, вызвавшего эпидемический подъем заболеваемости в 2007г. Следует отметить, что штаммы, изолированные в 2007 г. и 2012-2013 г.г. образовывали два субкластера, отличающихся по нуклеотидным последовательностям области генома VP2-VP4 на 6,3% тогда как внутри каждого из субкластеров последовательности отличались не более чем на 0,9%.

В кластер II (геновариант ЕСНО30\_ е) вошли 56 из 57 штаммов, изолированных в 2008-2009 г.г., от больных ЭВМ в г. Екатеринбурге, Свердловской, Челябинской и Тюменской областей (31, 4, 18 и 3 штамма, соответственно), нуклеотидные последовательности которых совпадали не менее, чем на 98,8 процентов. 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 европейского происхождения исследованных штаммов, циркуляция которых была зафиксирована на территории УФО в 2008-2009 г.г.



Штаммы, обнаруженные 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).

Кластеризация штаммов, изолированных в 2008-2009 г.г. и 2012-2013 г.г. на территории УФО, свидетельствует о высокой скорости их распространения среди населения в указанные периоды времени.

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 (геновариант ЕСНО30\_h) и по нуклеотидной последовательности, кодирующей белки VP2-VP4, практически идентичны штаммам, обнаруженным в ликворе больных ЭВМ.

В таблице 4.2 представлены данные по количеству штаммов вируса ЕСНО30, относящихся к геновариантам а, е и h, выделенных за период наблюдения на территории г. Екатеринбурга, Свердловской и сопредельных областей.

**Геноварианты вируса ЕСНО 30, изолированные в г. Екатеринбурге,  
на территории Свердловской и сопредельных областей в 2007-20014**

**г.г.**

Год	Количество штаммов	Количество геновариантов		
		a	E	h
2007	6	6	0	0
2008	18	0	18	0
2009	39	1	38	0
2010	0	0	0	0
2011	0	0	0	0
2012	1	1	0	0
2013	84	7	0	77
2014	34	0	0	34
Всего	182	15	56	111

Как видно из представленных данных, за период наблюдения удалось зафиксировать смену доминирующих геновариантов вируса ЕСНО30, циркулировавших на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области в 2007г., 2008-2009 г.г. и 2013-2014 г.г. (геноварианты а, е и h, соответственно). Коциркуляция двух геновариантов отмечена в 2009г. (а+е) и 2013 г. (а+h).

Также были выявлены филогенетические связи выявленных в УФО эпидемически значимых геновариантов вируса ЕСНО30 с эпидемически значимыми геновариантами, выделенными до эпидемических подъемов заболеваемости на территориях Украины и Китая.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в течение 8 лет на территории г. Екатеринбурга происходила

последовательная смена трех циркулирующих геновариантов вируса ЕСНО30 (а, е и h), вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости ЭВМ в 2007-2008 и 2013-2014 г.г.

В таблице 4.3 представлены результаты сравнения участков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей анализируемых штаммов вируса ЕСНО30, отражающие степень их генетического родства.



929	Первоуральск 2013	758	Первоуральск 2008	368	86,4	96,7	381	84,3	98,4
3960	Екатеринбург 2013	В3	Екатеринбург 2008	370	78,1	95,1	303	79,2	96
2897	Здоровый 2013	5396	Екатеринбург 2013	-	-	-	406	99	100
312е	Екатеринбург 2014	5396	Екатеринбург 2013	-	-	-	406	98,3	100
580	Курган 2013	5396	Екатеринбург 2013	-	-	-	406	99,5	100
17	Тюмень 2013	5396	Екатеринбург 2013	-	-	-	406	99	100
360	Челябинск 2009	А6	Екатеринбург 2009	-	-	-	396	99,5	99,2
42	Тюмень 2009	А6	Екатеринбург	-	-	-	397	99,3	98,5

			2009						
634	Екатеринбург 2007	EU280311	Украина 2005	394	97,2	99	-	-	-
717	Екатеринбург 2012	EU280311	Украина 2005	361	95,6	99,2	-	-	-
717	Екатеринбург 2012	634	Екатеринбург 2007	361	93,6	98,3	-	-	-

#### **4.2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вируса ЕСНО6, выделенных на территории Свердловской области в 2005-2014 гг.**

Вирус ЕСНО6 является одним из широко циркулирующих энтеровирусов, периодически вызывающих эпидемические вспышки и сезонные подъемы заболеваемости, в основном, асептическим менингитом, как на территории России, так и в других странах [31, 47, 58, 74, 79, 92, 113, 152]. Для вируса ЕСНО6, как и для многих других ЭВ, свойственна генетическая гетерогенность, коциркуляция и последовательная смена доминирующих геновариантов на определенной территории [47, 88, 131]. По результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей, депонированных в международной базе данных GeneBank, штаммы вируса ЕСНО6 были сгруппированы в три геноварианта: А, В и С [140].

На территории Свердловской области за последние 10 лет 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 асептического менингита постепенно нарастал [60]. В 2012 г. данный серотип стал доминирующим среди штаммов энтеровирусов, выделенных, как от больных ЭВМ (41,1%), так и от клинически здоровых детей г. Екатеринбурга (40%).

В связи с длительной циркуляцией и высокой эпидемической значимостью вируса ЕСНО6 для Свердловской области, представлялось актуальным изучение его филогенетических связей и степени генетической изменчивости штаммов, циркулирующих как среди детей

с бессимптомной формой инфекции, так и выделенных от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга и Свердловской области в разные периоды времени.

При построении филограммы 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 (табл. 4.4).

Таблица 4.4

**Штаммы вируса ЕСНО6, использованные для построения  
филограммы**

Год	Область	Диагноз	Населенный пункт	Кол-во штаммов	VP1 GB No	VP2 GB No
2005	Свердловская	ЭВИ	Екатеринбург	1	KP842526	-
			Североуральск	1	-	-
2006	Свердловская	ЭВМ	Алапаевск	1	-	-
		ЭВИ	Алапаевск	1	-	-
			Богданович	1	-	-
			В. Синячиха	1	-	-
2007	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	2	-	-
			Первоуральск	1	-	-
2008	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	1	KP842525	FJ796973
2011	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	3	-	-
2012	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	61	KP842524 KP842519 KP842520 KP842522	KP747570 KP747571 KP747572 KP747567



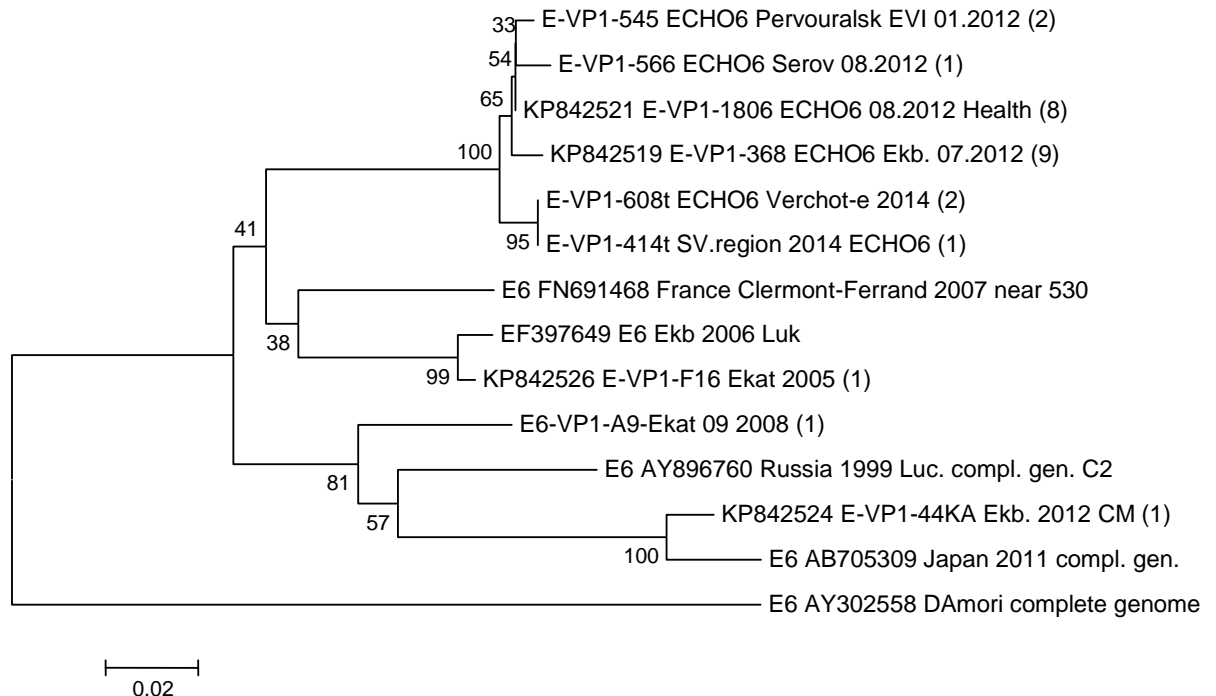
			Серов	1	-	-
	Челябинская		Челябинск	11	-	KP747569
	Свердловская	ЭВИ	Алапаевск	1	-	KP747566
			Первоуральск	2	-	-
	Свердловская	Контакт ЭВИ	Екатеринбург	1	-	-
	Свердловская	Здоровые	Екатеринбург	16	KP842521	KP747564
2013	Свердловская	ЭВМ	Полевской	1	-	KP747568
			Екатеринбург	4	-	KP747563
		ЭВИ	Екатеринбург	1	-	-
2014	Свердловская	ЭВМ	Верхотурье	1	-	KP747565
		ЭВИ		1	-	-
			Св. область	1	-	-
Итого				115		

По 3'-участку последовательности, кодирующей белок VP1 (655 нуклеотидов), проанализировано 28 штаммов; по нуклеотидной последовательности, кодирующей белок VP4 и начальную часть VP2 (658 нуклеотидов) - 111 штаммов (у 23 штаммов анализ проводился по двум участкам). В международной базе данных GenBank задепонировано 18 нуклеотидных последовательностей штаммов, в том числе: область VP1 – 8 последовательностей, VP4-VP2 – 12 последовательностей.

Нуклеотидные последовательности областей геномов VP1 и VP2 выравнивали по соответствующим последовательностям прототипного штамма ECHO6 D'Amorì (AY302558) и референтных штаммов из базы данных GenBank (FN691468, AB705309, AY896760, FN691460, JQ801739). Принадлежность штаммов к тому или иному геноварианту

вируса ЕСНО6 определяли по позициям нуклеотидов на участке генома, кодирующего белок VP1 [121].

На рисунке 4.3 представлены филогенетические взаимоотношения 26 штаммов вируса ЕСНО6, выделенных в 2005-2014 гг. на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области, отражающие степень их генетического родства по 3'-участку генома, кодирующего белок VP1, с референтными штаммами из базы данных GenBank и прототипным штаммом D`Amorì.



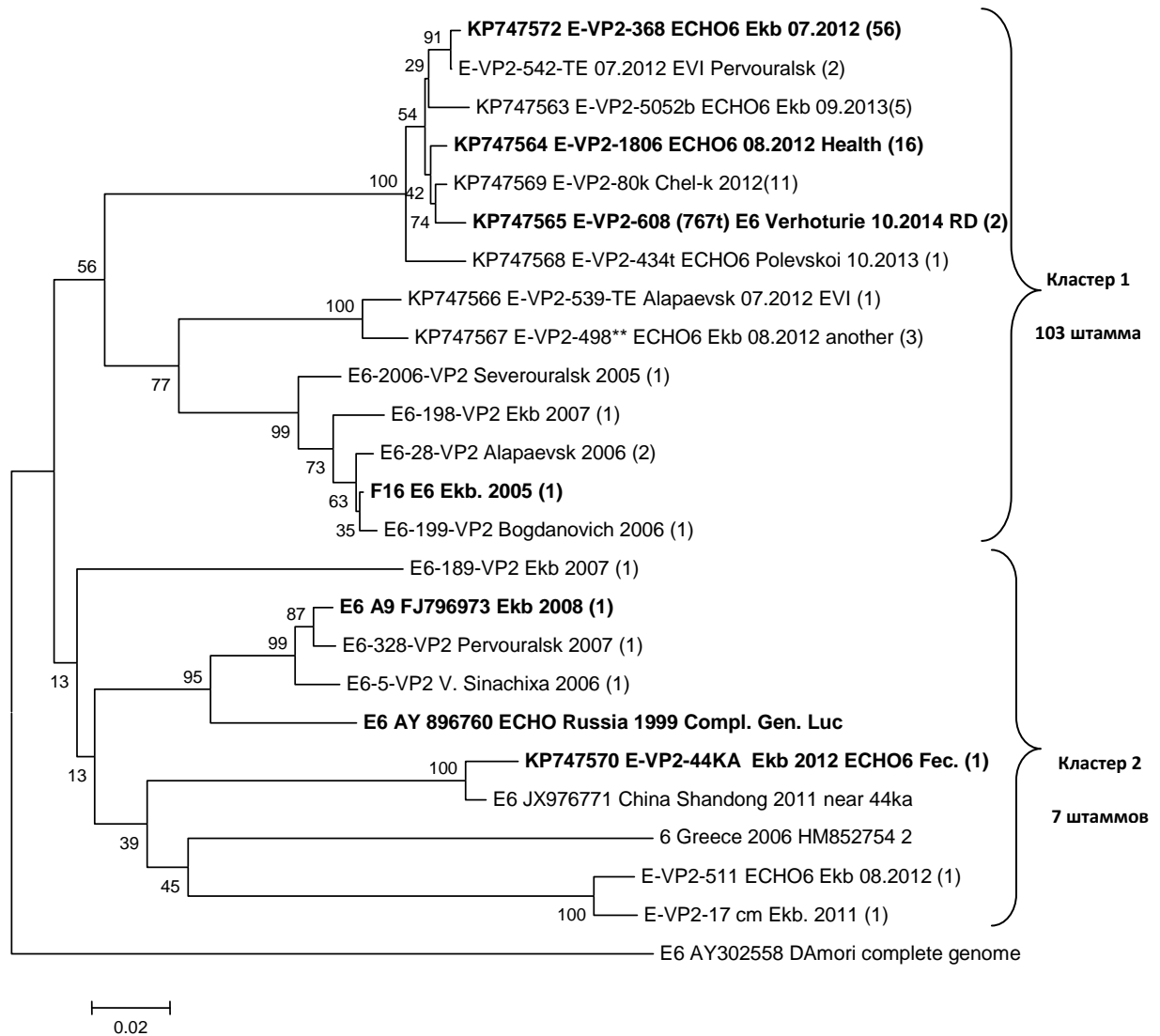
**Рисунок 4.3. Филограмма штаммов вируса ЕСНО6, выделенных в г. Екатеринбурге и на территории Свердловской области в период с 2005 по 2014 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующей белок VP1.**

Все исследованные штаммы группировались с прототипным штаммом D`Amorì, что на молекулярном уровне подтверждает их принадлежность к серотипу ЕСНО6. 24 штамма, из которых 16 были обнаружены в ликворе больных ЭВМ в 2005, 2006, 2012 и 2014 годах и 8

штаммов полученные от клинически здоровых детей в 2012 г., образовывали большой кластер, для которого в качестве референтного из базы данных GenBank был штамм E6 FN691468, выделенный во Франции в 2007 г.

Два штамма, выделенные от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга в 2008 и 2012 гг. были четко обособлены от других и группировались с референтными штаммами E6 AY896760 (Россия, 1999 г.) и E6 AB705309 (Япония, 2011 г.).

На филограмме, построенной по последовательности, кодирующей белок VP2 (рис. 4.4), представлено 110 штаммов, из которых 103 образуют большой кластер, включающий 87 штаммов от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга, населенных пунктов Свердловской, Челябинской областей, выделенных в период с 2005 г. по 2013 г., (65, 11 и 11 штаммов, соответственно), и 16 штаммов обнаруженных у клинически здоровых детей г. Екатеринбурга в 2012 г.



**Рисунок 4.4. Филограмма штаммов вируса ЕСНО6, выделенных в г. Екатеринбурге и на территории Уральского Федерального округа в период с 2005 по 2014 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующей белок VP2.**

Малый кластер объединяет 7 штаммов, выделенных от больных ЭВМ из г. Екатеринбурга и населенных пунктов Свердловской области в 2006, 2007, 2008, 2011 и 2012 годах.

Как видно из данных, представленных на рис. 5.4, кластеризация штаммов, позиционированных на филограмме рис. 5.3, составленной по нуклеотидной последовательности, кодирующей VP1 (выделены жирным шрифтом), не изменилась.

В таблице 4.5 представлены результаты сравнения участков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей анализируемых штаммов вируса ЕСНО6, отражающие степень их генетического родства.

Таблица 4.5

**Результаты сравнения участков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей штаммов вируса ЕСНО6, позиционированных на филограммах (рис. 4.3 и 4.4)**

Сравниваемые штаммы				Область VP1			Область VP2		
Штамм 1		Штамм 2		Длина сравниваемого участка нуклеотидов	Идентичность (%)		Длина сравниваемого участка нуклеотидов	Идентичность (%)	
Номер штамма	Место и год обнаружения	Номер штамма	Место и год обнаружения		Нуклео- тиды	Амино- кислоты/ длина		Нуклео- тиды	Амино- кислоты / длина
368	Екб 2012	44 КА	Екб 2012	504	<b>85,1</b>	<b>97,8</b>	570	<b>81,5</b>	<b>100</b>
368	Екб 2012	608t	Верх-е 2014	475	<b>97,9</b>	<b>98</b>	575	<b>97,5</b>	<b>100</b>
368	Екб 2012	EF397649*	Екб 2006	388	<b>91</b>	<b>96,9</b>	н/д	н/д	н/д
368	Екб 2012	A9	Екб 2008	498	<b>87,6</b>	<b>96,3</b>	529	<b>85,1</b>	<b>98,5</b>
368	Екб 2012	1806	Екб 2012 3Д	497	<b>98,2</b>	<b>98,2</b>	571	<b>98,1</b>	<b>100</b>

F16	Екб 2005	EF397649*	Екб 2006	418	<b>99,1</b>	<b>100</b>	н/д	н/д	н/д
F16	Екб 2005	A9	Екб 2008	527	<b>88,8</b>	<b>96,6</b>	533	<b>88,2</b>	<b>97,7</b>
608t	Екб 2014	A9	Екб 2008	469	<b>88,3</b>	<b>97,4</b>	388	<b>84,5</b>	<b>98,6</b>
A9	Екб 2008	AY896760*	1999	525	<b>92,2</b>	<b>97,7</b>	531	<b>93</b>	<b>98,5</b>
44ka	Екб 2012	AY896760*	1999	536	<b>90,3</b>	<b>99,4</b>	н/д	н/д	н/д
368	Екб 2005	608t	Екб 2014	478	<b>91,2</b>	<b>98,1</b>	н/д	н/д	н/д

\* Штаммы описаны в статье [47], нуклеотидные последовательности задепонированы А. Н. Лукашевым и соавт.

Прежде всего, необходимо отметить, что идентичность сравниваемых штаммов по нуклеотидным последовательностям, кодирующим белки VP1 и VP2, не имела достоверных различий.

Согласно полученным данным, практически идентичными можно считать штаммы из большого кластера, выделенные в 2005-2006 гг. от больных ЭВМ из городов Екатеринбурга, Алапаевска и Богдановича, а также штаммы, выделенные от больных и клинически здоровых лиц в 2012 г. в г. Екатеринбурге и городах Свердловской области. Штаммы из большого кластера, выделенные в 2012 и 2014 гг. отличались между собой по нуклеотидным последовательностям менее чем на 3%, а различия нуклеотидных последовательностей штаммов, выделенных в 2005 и 2012 г. составили менее 10%, что свидетельствует в пользу их общего происхождения и является доказательством длительной циркуляции, эндемичных для территории Свердловской области штаммов вируса ЕСНО6.

Штаммы, группирующиеся в малом кластере, имели существенные отличия в нуклеотидных последовательностях от штаммов, позиционированных в большом кластере (в среднем, на 15%) и высокую степень генетического родства с референтными штаммами, выделенными в России (Е6 АУ 896760, 1999 г.), Китае (Е6 JX976771, 2011) и Греции (6 Greece 2006 YM852754), что указывает на их разное происхождение.

Единичные случаи обнаружения в 2006, 2007, 2008, 20011 и 2012 годах в ликворе больных ЭВМ штаммов, локализующихся в малом кластере филограмм (рис. 6.3 и 6.4), свидетельствует о факте коциркуляции на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области штаммов вируса ЕСНО6 разного происхождения. При этом доминирующую роль в этиологии ЭВМ играют эндемичные штаммы, циркулирующие среди населения в течение не менее чем 10 лет.



Исходя из вышеизложенного, можно сделать заключение о том, что в г. Екатеринбурге и на территории Свердловской области за период наблюдения происходила циркуляция, в основном, близкородственных эндемичных штаммов вируса ЕСНО6, вызвавших в 2005 и 2006 гг. эпидемические вспышки с высоким уровнем заболеваемости ЭВМ в г. Североуральске и г. Алапаевске, а в последующие годы идентифицированных в качестве этиологических агентов спорадических случаев ЭВМ в г. Екатеринбурге и ряде населенных пунктов Свердловской области. В 2012 г. установлена доминирующая роль эндемичных штаммов вируса ЕСНО6 во время эпидемического подъема заболеваемости в г.Екатеринбурге.

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

Вирус Коксаки А9 является одним из часто встречающихся этиологических агентов ЭВИ. По результатам 5 летнего мониторинга СА9 в качестве возбудителя ЭВИ (менингеальной формы) в г. Екатеринбурге обнаруживался в 20,5 процентов случаев. В 2011г. он вызвал 57% лабораторно подтвержденных случаев заболевания, в 2012 – в 13%, в 2013- в 10%, в 2014- в 2%. Сохраняется ежегодная регистрация СА9 в качестве этиологического агента ЭВМ, поэтому актуальным является проведение филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей штаммов, выделенных из биологического материала больных СМ в Екатеринбурге, Челябинске и некоторых городах Свердловской области.

При построении филограмм были проанализированы нуклеотидные последовательности 57 штаммов вируса СА9, выделенных в период с 2008 по 2013 годы из биологического материала (ликвор, фекалии) от 51

больного ЭВИ (преимущественно менингеальная форма), проживающих в г. Екатеринбурге, Свердловской, Челябинской областях, от 6-ти детей с бессимптомной формой инфекции из г. Екатеринбурга (табл. 4.6).

**Количество штаммов вируса Коксаки А9, использованных для построения  
филограмм**

Год	Область	Диагноз	Населенный пункт	Кол-во штаммов	VP1 GB по	VP2 GB по
2008	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	8	KP842498	FJ796969
						FJ752578
						FJ752579
						FJ752580
						FJ752581
						FJ752582
						FJ752583
						FJ752584
		ЭВИ	Первоуральск	1	KP842500	GQ281600
			Березовский	1	KP842499	GQ281592
2011	Свердловская	Здоровый	Екатеринбург	3	KP842496 KP842495	KP747493
		ЭВМ	Екатеринбург	8	KP842497 KP842501	KP747491 KP747492
2012	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	18	KP842502 KP842507	KP747490 KP747497
			Серов	1	KP842503	KP747494
	Челябинская		Челябинск	1	-	KP747499
	Свердловская		Здоровый	Екатеринбург	2	KP842506
2013	Свердловская	ЭВМ	Екатеринбург	11	KP842504 KP842505	KP747496 KP747495
			Первоуральск	1	-	-
		ЭВИ	Алапаевск	1	-	KP747498

		Здоровый	Екатеринбург	1	-	КР747489
Итого				57		

Нуклеотидные последовательности областей геномов VP1 и VP2 выравнивали по последовательности прототипного штамма Griggs (D00627) [162, 125] и референтных штаммов из базы данных GenBank (JQ837914, JQ837913, JQ837914).

Проведенный филогенетический анализ для 57 нуклеотидных последовательностей VP2 НПЭВ, выделенных с 2008 по 2014 гг. в Екатеринбурге от больных ЭВМ показал, что все штаммы группировались в два кластера.

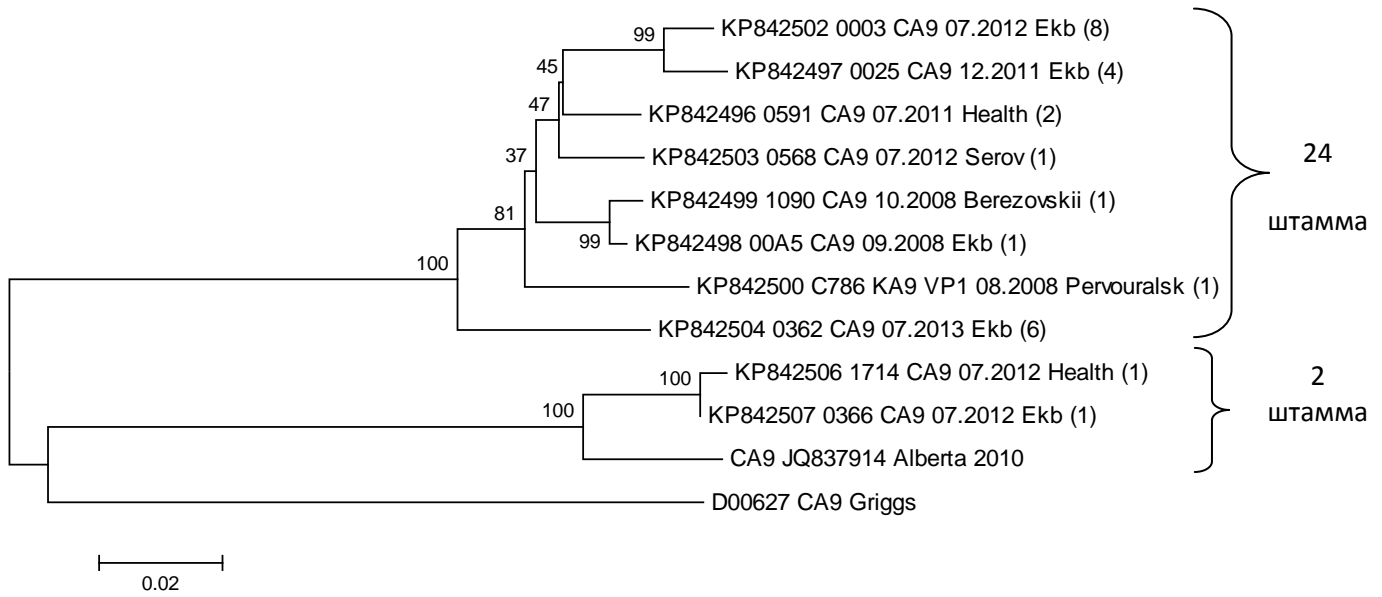
Первый, самый многочисленный кластер (49 штаммов), представлен штаммами, обнаруженными, преимущественно, от больных ЭВМ в 2008, 2011, 2012, 2013 гг. в Екатеринбурге и городах Свердловской области (Серов, Березовский, Первоуральск). В этот же кластер вошли нуклеотидные последовательности штаммов, обнаруженных в пробах фекалий детей с бессимптомной формой инфекции. Аминокислотная последовательность вируса, выделенного от ребенка с бессимптомной формой инфекции, отличалась от последовательности, обнаруженных в пробах ликвора больных на 2,8% (Таблица 4.7) и не сформировала отдельного кластера.

Второй кластер образован штаммами, выделенными в Екатеринбурге и Челябинске в 2012 году, Первоуральске, Алапаевске в 2013 году. Все они группируются со штаммами, выделенными в Канаде в 2010 и 2003 гг. [162].

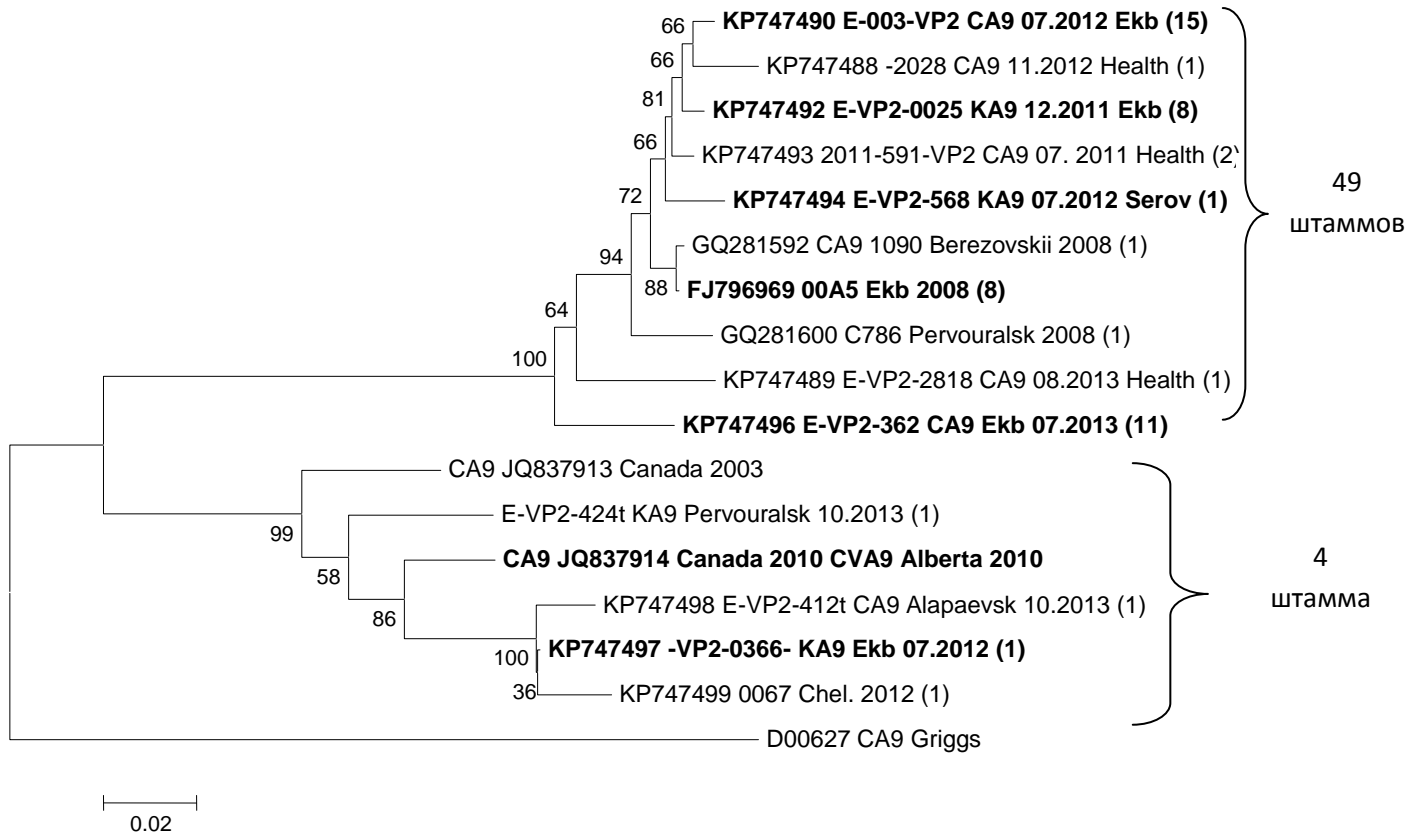
Для некоторых штаммов были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие белок VP1. (Всего по последовательности VP1 проанализировано 26 штаммов). Как видно из данных, представленных на рис. 6.6, кластеризация штаммов, позиционированных на филограмме рис. 6.5, составленной по нуклеотидной последовательности, кодирующей VP1 (выделены жирным шрифтом), не изменилась.

В таблице 4.7 представлены результаты сравнения участков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей анализируемых штаммов вируса СА9, отражающие степень их генетического родства.

Из представленных данных видно, что на территории г. Екатеринбурга в течение четырехлетнего периода одновременно циркулировали как минимум два генетических варианта вируса СА9. Преобладающее количество штаммов группировалось с вирусом, выделенным на этой же территории в 2008 году. Логичным было бы предположить, что данные штаммы являются эндемичными для Екатеринбурга и циркулируют на его территории в течение длительного времени. Отмечено отсутствие четкой кластеризации штаммов по степени их вирулентности и времени обнаружения. Одновременная идентификация штаммов аналогичных генетических вариантов в Екатеринбурге, Челябинске и городах Свердловской области свидетельствует об их широкой циркуляции на территории УФО.



**Рисунок 4.5** Филограмма штаммов вируса CA9, выделенных в г. Екатеринбург и на территории Уральского Федерального округа в период с 2008 по 2013 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующей белок VP1.



**Рисунок 4.6** Филограмма штаммов вируса Коксаки А9, выделенных в г. Екатеринбург и на территории Уральского Федерального округа в

**период с 2008 по 2014 год, построенная по последовательности нуклеотидов, кодирующей белок VP2.**



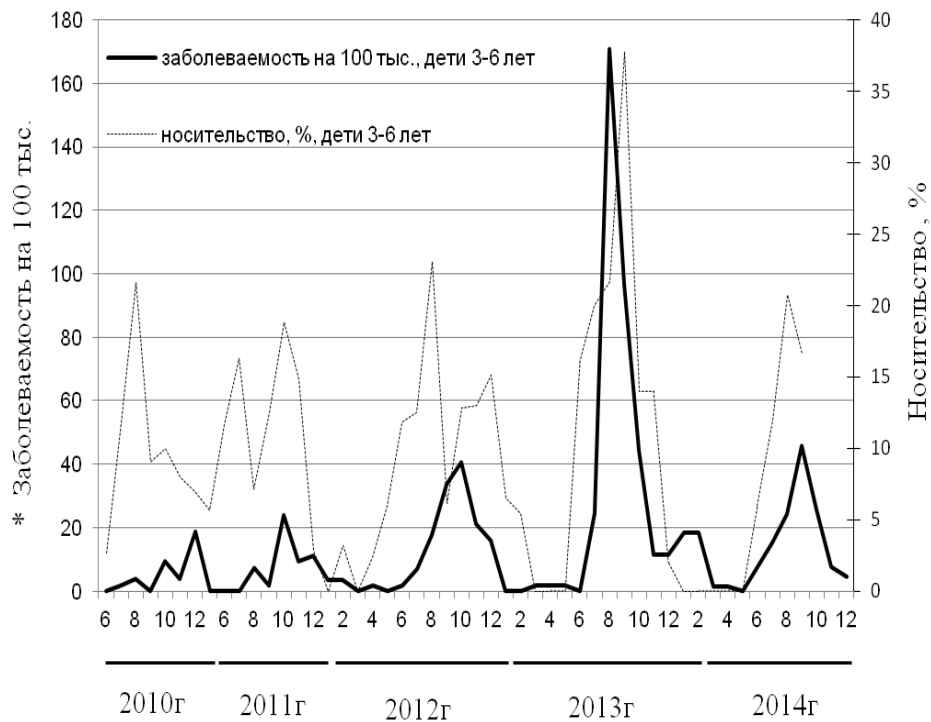


КР842498 00А5	Екатеринбург 09.2008	КР842502 0003	Екатеринбург 07.2012	561	<b>95,8</b>	<b>97,3</b>	393	<b>98,3</b>	<b>98,5</b>
КР842504 0362	Екатеринбург 07.2013	КР842502 0003	Екатеринбург 07.2012	528	<b>92,9</b>	<b>97,2</b>	312	<b>94,3</b>	<b>99</b>
КР842497 0025	Екатеринбург 12.2011	КР842496 0591	Екатеринбург 07.2011 ЗД*	543	<b>96</b>	<b>97,8</b>	348	<b>98,8</b>	<b>99</b>

\*ЗД-здоровый

## Глава 5. Сравнительный анализ спектра и частоты выявления неполиомиелитных энтеровирусов у больных энтеровирусным менингитом и здоровых лиц.

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. 5.1).



**Рисунок 5.1. Показатели заболеваемости энтеровирусным менингитом и процент вирусовыделителей 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, что хорошо согласуется с литературными данными [81]. 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.

Начало сезонного повышения процента вирусовыделителей удается зарегистрировать раньше, чем начало подъема уровня заболеваемости серозным менингитом, однако в каждом конкретном случае дать прогноз относительно срока ожидаемого подъема заболеваемости не представляется возможным, поскольку сроки этого опережения могут варьировать от одного до четырех месяцев.

Регистрация двухволнового характера повышения уровня циркуляции НПЭВ, по-видимому, позволяет с определенной долей вероятности прогнозировать сдвиг по времени повышения уровня заболеваемости на конец осени, однако для уточнения достоверности такого прогноза требуются дальнейшие наблюдения.

Генотипирование штаммов, выделенных от клинически здоровых детей индикаторной группы, позволяет более полно, по сравнению с вирусологическим методом, определить спектр циркулирующих НПЭВ и дает возможность зафиксировать наличие или отсутствие доминирующего серотипа. Полученная информация может быть использована для оценки патогенного потенциала того или иного серотипа, его эпидемиологической значимости и риска неблагоприятного развития эпидемического процесса в текущем эпидсезоне.

Наиболее существенная с точки зрения оценки эпидемиологической значимости отдельных серотипов информация была получена в результате сравнительного анализа спектра и частоты выявления серотипов НПЭВ у клинически здоровых лиц и больных ЭВМ (табл. 5.1).

Таблица 5.1

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

Группа НПЭВ	Серотипы НПЭВ							
	2011г.		2012г.		2013г.		2014г.	
	ЗД*	ЭВМ	ЗД	ЭВМ	ЗД	ЭВМ	ЗД	ЭВМ
Коксаки А	1,2,5,6,9 13,22	9	4,9,21,22	9	2,4,5,9,17, 19 21,22	9	4,8,22, 24	9
Коксаки В	-	-	3,5	1,2,3,4,5	2,4	2,3,4,5	5	4,5
ЕСНО	-	6,9,17,18	<b>6(40%),</b> 3,18,25	<b>5, 6(41,1%),</b> 7, 14,18,25,30	11,25 <b>30(12%)</b>	6, 8,9,11,14, <b>30 (58,5%)</b>	14	2,14,18, <b>30</b> <b>(59%)</b>
EV77	1	-	-	-	-	-	-	-
Всего серотипов	8	5	10	13	13	11	6	7

\* - здоровые вирусоносители

Полужирным курсивом обозначены доминирующие серотипы НПЭВ; в скобках указан процент обнаружения соответствующего серотипа среди выявленных штаммов.

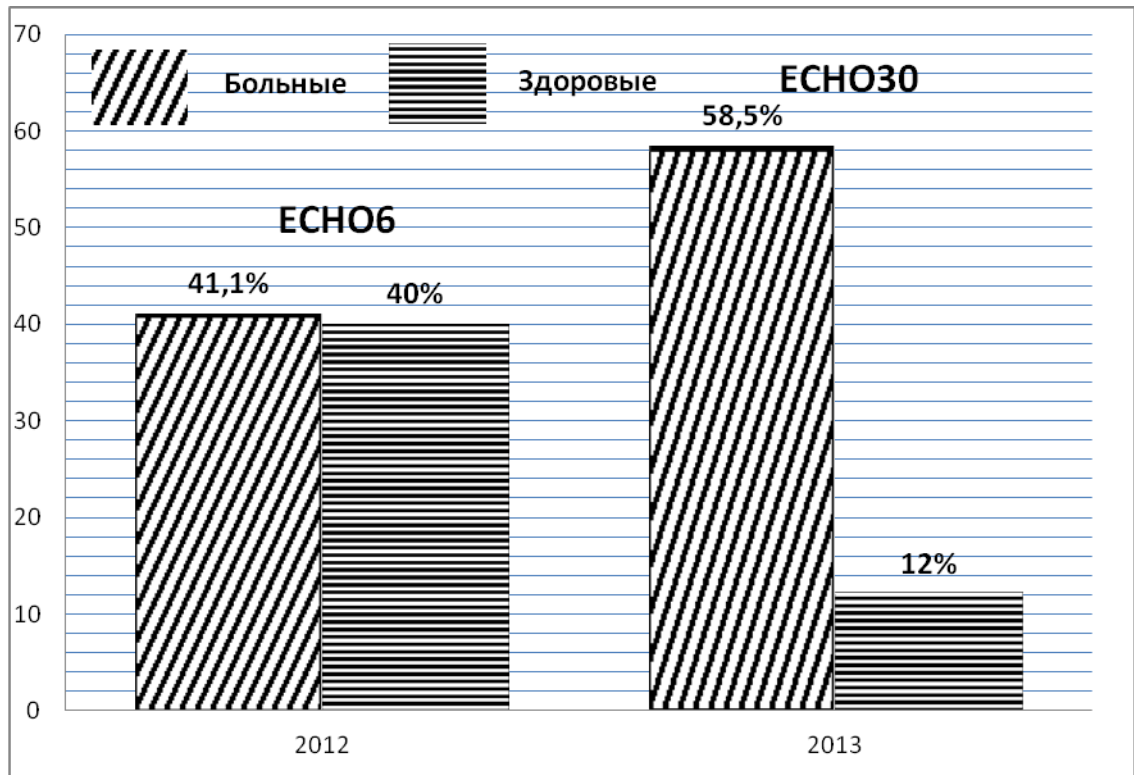
Как видно из представленных данных, наиболее разнообразный спектр серотипов вирусов Коксаки А был выявлен в группе здоровых вирусоносителей, тогда как в ликворе больных на протяжении пяти лет обнаруживался только вирус Коксаки А9.

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

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

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

Обращает на себя внимание тот факт, что в 2012 году доминирующим серотипом, изолированным как от больных, так и от здоровых лиц практически в равном проценте случаев (41,1% и 40%, соответственно,  $p=0,9$ ) был вирус ЕСНО6 (рис. 5.2).



**Рисунок 5.2. Частота встречаемости доминирующих этиологических агентов энтеровирусного менингита среди серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у больных и клинически здоровых лиц.**

В 2013 дальнейший подъем заболеваемости был связан с активным включением в циркуляцию вируса ЕСНО30, на долю которого приходилось около 60% случаев серозного менингита. При этом следует особо отметить, что от здоровых носителей данный серотип выделялся в 5 раз реже в 2013 г. (58,5% и 12%, соответственно,  $p=0,001$ ) и не был обнаружен ни в одном случае в 2014 г. 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 [154].

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.5,2);

3. Частота вирусоносительства (табл. 3.5);

4. Доля доминирующего этиологического агента среди штаммов, обнаруженных в фекалиях клинически здоровых детей индикаторной группы (рис. 5.2);



Зная заболеваемость (на 1000 контингента) и долю доминирующего серотипа у больных ЭВМ (%), вычисляли заболеваемость по доминирующему серотипу на 1000 путем составления пропорции (табл. 5.2).

Аналогичным образом, зная частоту вирусносительства и долю доминирующего серотипа у носителей (%), вычисляли частоту носительство доминирующего серотипа на 1000 (табл. 5.2).

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 5.2

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

Год	Заболеваемость (на 1000 контингента)	Доминирующий серотип	Доля доминирующего серотипа у больных ЭВМ (%)	Заболеваемость по доминирующему серотипу (на 1000)	Вирусносительство (на 1000)	Доля доминирующего серотипа у носителей (%)	Носительство доминирующего серотипа (на 1000)	количество инфицированных на 1 случай заболевания
2012	1,47*	Е6	41,1	0,6	114	40	45,6	76:1
2013	3,2*	Е30	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 12,5 раз выше и составлял 6,3:1 (табл. 5.2).

Суммируя вышеизложенное можно сделать вывод о том, что сравнительный анализ результатов систематического мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения и спектра этиологических агентов ЭВМ дает информацию о масштабах циркуляции, степени 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 степени вирулентности и эпидемиологического потенциала циркулирующих штаммов.

## Обсуждение

Система Государственного санитарно-эпидемиологического надзора за неполиомиелитными вирусными инфекциями регламентирована МУ 3.1.1.2363-08 и 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) [89, 91, 158].

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. Это диктует необходимость поиска новых подходов к повышению информативности методов исследования эпидемического процесса, позволяющих оценить масштабы циркуляции НПЭВ среди здорового населения, а также спектр и вирулентность циркулирующих серотипов.

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, исследование проб, полученных от больных ЭВИ, позволяет выявить спектр возбудителей и доминирующий этиологический агент, однако оставляет открытым вопрос о степени его вирулентности, что

существенно затрудняет прогнозирование развития эпидемического процесса [128, 189].

Проводимые уже в течение более 50 лет в разных странах мира санитарно-вирусологические исследования показали их безусловную необходимость для индикации скрытой циркуляции «диких» штаммов полиовирусов. Однако многочисленные факты обнаружения того или иного НПЭВ в сточной воде не поддаются однозначной интерпретации ввиду случайного характера выявления одного-двух возбудителей из множества серотипов, циркулирующих среди населения на данной территории в данное время. Серьезные ограничения по определению спектра выявляемых НПЭВ связаны с перmissивностью используемых клеточных культур, поскольку за пределами поля зрения исследователей остается большая группа некультивируемых и плохо культивируемых серотипов. Кроме того, в ряде работ отмечается наличие среди выделенных штаммов высокого процента нетипируемых цитопатогенных агентов, а также частое несовпадение спектра серотипов, обнаруживаемых в объектах внешней среды и у больных ЭВИ [190].

Применение молекулярно-генетического метода индикации НПЭВ (ПЦР) в сточных водах позволяет значительно повысить процент обнаружения положительных проб, однако попытки дальнейшего генотипирования методом секвенирования в подавляющем большинстве случаев являются безуспешными в связи с тем, что в пробах присутствует более одного серотипа НПЭВ [181].

Анализ данных литературы показал, что многочисленные исследования частоты вирусоносительства НПЭВ с использованием вирусологического метода носили фрагментарный характер и ограничивались констатацией фактов выявления тех или иных серотипов среди лиц в организованных коллективах, либо возрастных группах населения. В пробах фекалий, полученных от клинически

здоровых детей, присутствие НПЭВ удавалось обнаружить в 5-10 процентах случаев [42, 70, 78, 175]. При этом спектр выявляемых серотипов ограничивался штаммами, способными к репродукции на используемых клеточных культурах, в то время как большинство серотипов НПЭВ, относящихся к некультивируемым и плохо культивируемым, остается вне поля зрения исследователей.

Отсутствие работ по длительному систематическому мониторингу циркуляции НПЭВ среди здорового населения, очевидно, было связано с высокой трудоемкостью и затратностью использования вирусологического метода исследования.

Использование молекулярно-генетических методов исследования позволяет избежать рестрикции, обусловленной клеточным тропизмом, и получить более полную информацию о частоте вирусоносительства и спектре НПЭВ, циркулирующих среди здорового населения.

Внедрение в практику автоматизированных молекулярно-генетических методов исследования и доступность методов идентификации геномных последовательностей обеспечили возможность осуществлять полноценный систематический мониторинг циркуляции НПЭВ среди населения крупных городов. Результаты мониторинга могут быть использованы для повышения эффективности санэпиднадзора за ЭВИ путем выявления тенденций развития эпидемического процесса и прогнозирования эпидемиологической ситуации.

Одной из основных задач настоящей работы явилась оценка возможности использования информации, полученной в результате сравнительного анализа показателей частоты выявления и спектра НПЭВ, обнаруживаемых у больных ЭВМ, с аналогичными показателями у клинически здоровых лиц. Информация, получаемая в результате такого анализа, обеспечивает повышение эффективности эпидемиологического надзора за ЭВИ, прежде всего, в плане

расширения информационного поля для оперативного анализа эпидемиологической обстановки, повышения достоверности предэпидемической диагностики предпосылок и предвестников осложнения эпидемической ситуации.

В период наблюдения (2008-2014 гг.) уровень заболеваемости ЭВМ в г. Екатеринбурге менялся в широких пределах: от 5,04 в 2011 г. до 29,92 на 100 тыс. населения в 2013 г. Наиболее высокий уровень заболеваемости наблюдался у детей в возрасте 3-6 лет: 49,89 и 320,0 на 100 тыс. детей данной возрастной группы в 2011 г. и 2013 г., соответственно.

По имеющимся данным литературы, с помощью вирусологического метода в клиническом материале от больных ЭВМ г. Екатеринбурга за последние 10 лет цитопатогенные агенты удавалось обнаружить в 15-68% случаев, причем, в отдельные годы доля нетипируемых изолятов составляла 80% [60, 61]. Спектр идентифицированных НПЭВ ограничивался штаммами, способными к репродукции на клеточных культурах Нер-2 и RD. Как правило, доминирующими серотипами, изолированными на клеточных культурах, были вирусы Коксаки группы В. Из группы вирусов ЕСНО только три серотипа (ЕСНО6,11,30) удавалось выделить достаточно эффективно.

В результате проведенных нами исследований было установлено, что в период с 2008 г. по 2014 г. в качестве этиологических агентов ЭВМ в г. Екатеринбурге фигурировало не менее 18 серотипов энтеровирусов, относящихся к виду В, в том числе, 7 серотипов, относящихся к некультивируемым или плохо культивируемым (Коксаки А9, ЕСНО2,5,9,14,25, EV97). Из 366 идентифицированных штаммов подавляющее большинство (73%) было представлено вирусами ЕСНО, причем ведущая роль принадлежала вирусам ЕСНО6 и ЕСНО30, доля каждого из которых составила 30,1 и 39,9%, соответственно, от

количества обнаруженных в этой группе штаммов. Указанные серотипы явились доминирующими этиологическими агентами ЭВМ в 2008 г., 2012 г. (ЕСНО6) и в 2013 г. (ЕСНО30). Высокая результативность генотипирования и достаточно большое количество идентифицированных штаммов НПЭВ, обнаруженных в ликворе больных ЭВМ позволили сделать заключение о полиэтиологичности ЭВМ в каждом эпидсезоне и выделить группу из четырех возбудителей (Коксаки А9, ЕСНО6,18,30), на долю которых в период наблюдения приходилось более 70% случаев заболевания ЭВМ в г. Екатеринбурге.

Филогенетический анализ наиболее часто обнаруживаемых этиологических агентов ЭВМ показал, что в г. Екатеринбурге и на территории Свердловской области за период наблюдения происходила циркуляция, в основном, близкородственных эндемичных штаммов вируса ЕСНО6, вызвавших в 2005 и 2006 гг. эпидемические вспышки с высоким уровнем заболеваемости ЭВМ в г. Североуральске и г. Алапаевске, а в следующие 5 лет обнаруживаемых в качестве этиологических агентов спорадических случаев ЭВМ в г. Екатеринбурге и ряде населенных пунктов Свердловской области. В 2012 г. установлена доминирующая роль эндемичных штаммов вируса ЕСНО6 во время эпидемического подъема заболеваемости в г.Екатеринбурге.

Было показано, что в период с 2007г. по 2014 г. происходила смена доминирующих геновариантов вируса ЕСНО30, циркулировавших в 2007г., 2008-2009 г.г. и 2013-2014 г.г. (геноварианты а, е и h, соответственно). Коциркуляция двух геновариантов отмечена в 2009г. (а+е) и 2013 г. (а+h). Выявлены филогенетические связи эпидемически значимых геновариантов ЕСНО30 с референтными штаммами выделенными на территориях Украины (геновариант е) и Китая (геновариант h).

При анализе филогенетических связей штаммов вируса Коксаки А9, доля которого в этиологической структуре возбудителей ЭВМ

ежегодно была существенной, установлено, что на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области в период с 2008 г. по 2014 г. одновременно циркулировали как минимум два генетических варианта вируса Коксаки А9. Преобладающее количество штаммов (53 из 57 штаммов) имело близкое генетическое родство со штаммами, выделенными в г. Екатеринбурге в 2008 г. Отсутствие в базе данных GenBank референтных штаммов для этой группы вирусов позволяет сделать заключение о циркуляции на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области эндемичных штаммов вируса Коксаки А9.

Таким образом, проведенные исследования позволили существенно расширить представление о спектре серотипов НПЭВ, являющихся этиологическими агентами ЭВМ, выделить группу наиболее эпидемиологически значимых возбудителей, циркулирующих на территории г. Екатеринбурга и установить их филогенетические связи.

В результате пятилетнего мониторинга частоты выявления НПЭВ у практически здоровых детей 3-6 лет было установлено, что на фоне существенных колебаний показателя заболеваемости ЭВМ (от 49,89 до 320,0 на 100 тыс. детей данной возрастной группы) процент вирусовыделителей из года в год менялся незначительно (9,5%-14%). Начало сезонного повышения частоты выявления НПЭВ, как правило, удавалось зарегистрировать раньше, чем начало подъема уровня заболеваемости ЭВМ, однако дать прогноз относительно срока ожидаемого подъема заболеваемости не представлялось возможным, поскольку сроки этого опережения в разные годы варьировали от одного до четырех месяцев.

Типовой состав обнаруженных НПЭВ из года в год претерпевал существенные изменения и отличался большим разнообразием, по сравнению со спектром серотипов, обнаруженных у больных ЭВМ. Всего за период наблюдения была зафиксирована циркуляция 25



серотипов НПЭВ. Наибольшее разнообразие серотипов было выявлено среди вирусов Коксаки А (12 из 25 серотипов). Если все серотипы НПЭВ, выявленные у больных ЭВМ, принадлежали виду В, то у лиц с бессимптомной инфекцией обнаруживались энтеровирусы видов А, В и С. Преобладающее количество штаммов у практически здоровых носителей относилось к вирусам Коксаки А и ЕСНО (40% и 36%, соответственно), в то время как вирусы Коксаки В обнаруживались лишь в 24% случаев.

Полученные данные о типовом составе и частоте выявления НПЭВ среди населения существенным образом отличались от результатов вирусологического исследования сточных вод. В таблице 6.1 даны в сравнении результаты вирусологического исследования сточных вод г. Екатеринбурга за период с 1998 г. по 2010 г., предоставленные Федеральной службой Роспотребнадзора по Свердловской области, и результаты молекулярно-генетического мониторинга циркуляции НПЭВ среди населения, полученные в настоящем исследовании.

Таблица 6.1

**Частота выявления и количество обнаруженных серотипов вирусов Коксаки А, В и ЕСНО в пробах сточных вод и образцах фекалий клинически здоровых детей г. Екатеринбурга**

Объект исследования	Сточная вода (n=654)	Пробы фекалий от практически здоровых лиц (n=2114)
Сравнимые показатели		
Обнаружены НПЭВ	5,5%	10,7%
Количество обнаруженных серотипов	11	21

Группы вирусов:		
Коксаки А	0	40%
Коксаки В	62,4%	24%
ЕСНО	37,6%	36%

Как видно из представленных данных, процент выявления и количество обнаруженных серотипов НПЭВ в пробах фекалий здоровых детей оказались в 2 раза выше, по сравнению с аналогичными показателями для проб сточных вод. Почти две трети штаммов, обнаруженных в сточных водах, относились вирусам Коксаки В, чуть более одной трети штаммов составляли вирусы ЕСНО, а вирусы Коксаки группы А не были выявлены ни в одном случае.

На основании полученных данных можно сделать выводы о более низкой чувствительности вирусологического метода исследования сточных вод на наличие НПЭВ по сравнению с молекулярно-генетическим мониторингом их циркуляции среди здоровых детей, а также лишь о частичном соответствии спектра серотипов, обнаруживаемых в сточных водах, реальному составу циркулирующих среди населения серотипов НПЭВ.

Молекулярно-генетический мониторинг позволяет не только получить достоверную оперативную информацию о частоте выявления и спектре серотипов НПЭВ, циркулирующих среди населения, но также дает возможность оценить степень вирулентности и контагиозность штаммов, доминирующих среди этиологических агентов ЭВМ в текущем эпидсезоне.

Эпидемическая значимость штамма характеризуется вероятностью риска возникновения заболевания у инфицированных, которая выражается соотношением количества бессимптомных вирусоносителей, приходящихся на один случай манифестной инфекции. Процент лиц, перенесших субклиническую форму инфекции,

можно рассматривать в качестве косвенной оценки контагиозности штамма.

В настоящей работе указанные показатели были определены для вирусов ЕСНО6 и ЕСНО30, которые явились доминирующими этиологическими агентами ЭВМ во время сезонных эпидемических подъемов заболеваемости в 2012г. и 2013г. соответственно.

Вирус ЕСНО6 с наибольшей частотой обнаруживался как у больных, так и у здоровых лиц. Из этого следовало, что среди здорового населения имела место преимущественная циркуляция указанного серотипа. Зная процент здоровых вирусовыделителей в возрастной группе детей 3-6 лет, и долю среди них инфицированных вирусом ЕСНО6, представлялось возможным сравнить показатели инфицированности и заболеваемости ЭВМ в данной возрастной группе, чтобы вычислить вероятность риска возникновения заболевания у инфицированных. Соотношение количества бессимптомных вирусоносителей, приходящихся на один случай манифестной инфекции для данного серотипа (риск возникновения заболевания среди инфицированных) было равно 76:1.

Вирус ЕСНО30 в 2013 г. обнаруживался в 58,5% образцов ликвора от больных ЭВМ, а среди НПЭВ, выделенных из проб фекалий, его доля составляла всего 12%. Риск возникновения заболевания среди инфицированных для данного серотипа равнялся 6,3:1, то есть был в 12 раз выше, чем для вируса ЕСНО6.

Таким образом, штаммы вируса ЕСНО6 при высокой контагиозности характеризовались относительно низким эпидемическим потенциалом, в то время как штаммы вируса ЕСНО30 имели высокий эпидемический потенциал при относительно низкой контагиозности.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что штаммы НПЭВ, имеющие разный эпидемический потенциал и контагиозность, могут вызывать эпидемические подъемы

заболеваемости ЭВМ либо за счет включения в широкую циркуляцию и инфицирования больших групп населения, либо за счет высокой вирулентности при относительно низком уровне циркуляции.

Зная указанные характеристики доминирующих этиологических агентов ЭВМ, представляется возможным рассчитать ожидаемое количество случаев заболевания среди детей индикаторной возрастной группы населения мегаполиса, а также составить прогноз общей заболеваемости в текущем эпидсезоне. Анализ многолетних значений показателей общей заболеваемости ЭВМ и показателей для возрастной группы детей 3-6 лет г. Екатеринбурга показал, что в среднем соотношение между ними равняется 1:10 (табл. 6.2).

Таблица 6.2

**Показатели заболеваемости энтеровирусным менингитом среди жителей г. Екатеринбурга и в возрастной группе детей 3-6 лет**

Заболеваемость	Показатель заболеваемости (на 100 тыс.)			
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.
Общая	5,04	18,12	29,92	17,12
Дети 3-6 лет	49,89	147,1	373,3	181,4
Отношение	9,89	8,11	12,47	10,75
Среднее	10,305			

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что результаты молекулярно-генетического мониторинга НПЭВ позволяют установить спектр серотипов, длительно циркулирующих на данной территории, и получить необходимую оперативную информацию для ответа на следующие вопросы:

- какова динамика частоты вирусоносительства среди здорового населения в эпидемический и межэпидемический периоды;
- как и насколько изменился типовой состав циркулирующих НПЭВ в текущем эпидсезоне по сравнению с предыдущим;
- имеет ли место факт импортации на данную территорию эпидемически опасного серотипа или геноварианта НПЭВ;
- каково соотношение частоты обнаружения циркулирующих среди населения серотипов НПЭВ с частотой их встречаемости в качестве этиологических агентов ЭВИ;
- каков относительный уровень вирулентности и контагиозности доминирующего этиологического агента ЭВИ;
- какова вероятность неблагоприятного развития эпидемической ситуации по заболеваемости ЭВИ в предстоящем эпидсезоне.

Проведенные исследования показали, что включение систематического молекулярно-генетического мониторинга носительства штаммов НПЭВ в возрастной группе клинически здоровых детей 3-6 лет в программу мероприятий Государственного санитарно-эпидемиологического надзора за ЭВИ позволяет существенно повысить эффективность динамического наблюдения за эпидемическим процессом, поскольку дает дополнительную информацию для оперативной оценки и прогнозирования развития эпидемической ситуации на территории крупных населенных пунктов.

## **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.

## Список литературы

1. Алиев Н. Н. Выявление энтеровирусов у пациентов с острыми кишечными инфекциями на территории Азербайджанской республики в 1995-2004гг. / Н. Н. Алиев, Л. И. Рустамова, К. Н. Алиев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. - № 4. – С. 45-46.
2. Алиев Н.Н. Изучение молекулярно-биологических и вирусологических маркеров как важный компонент организации эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями / Н. Н. Алиев, Л. И. Рустамова, М. Ш. Азаев и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. - № 1. – С. 12-14.
3. Альмишева А. Ш. Эпидемиологические и экологические аспекты серозных менингитов энтеровирусной природы: автореферат диссертации кандидата медицинских наук: 14.00.30: защищена 01.2009г. / Альмишева Анфиса Шамилевна, Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» - М. 2008. - 12с.
4. Амвросьева Т. В. Энтеровирусная инфекция в республике Беларусь / Т. В. Амвросьева, Н. В. Поклонская, В. Л. Зуева, З. Ф. Богущ, К. Л. Дедюля, А. Н. Лукашев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. - №5 (Т.19). – С. 37-43.
5. Амвросьева Т.В. Молекулярная характеристика и филогенетический анализ энтеровирусов, вызвавших вспышки и сезонные подъёмы заболеваемости в разных регионах Республики Беларусь / Т.В. Амвросьева [и др.] // ЖМЭИ. – 2006. – № 3. – С. 17–21.
6. Амяга Е.Н. Идентификация и анализ новых и эпидемически значимых штаммов энтеровирусов с помощью молекулярно-биологического и филогенетического анализа / Е.Н. Амяга, А.Н.



Лукашев, О.Е. Троценко, П.В. Корита, В.И. Резник // Здоровье населения и среда обитания. - 2012. - № 9. - С. 17-20.

7. Ахмадишина Л. В. Сероэпидемиология и молекулярная эпидемиология энтеровируса 71 типа в Мире и в Российской Федерации / Л. В. Ахмадишина, Г. А. Королюева, О. Е. Иванова, О. Е. Троценко, М. И. Михайлов, А. Н. Лукашев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2013. - №6. - С. 112-121.

8. Ашмарина Е.Е. Кишечное носительство энтеровирусов у детей в осенние месяцы: материалы / Проблемная комиссия АМН СССР «Полиомиелит и вирусные энцефалиты», Выпуск 1, «Энтеровирусы». М., 1967. С. 20-21.

9. Беседина Л. В. Особенности циркуляции энтеровирусов в г. Екатеринбурге (1992-2005гг.) / Л. Г. Беседина, Н. С. Субботина, Н. Н. Сбитнева, Я. Б. Бейкин // Уральский медицинский журнал. – 2006. – 2. – С. 19-22.

10. Беседина Л. Г. Особенности циркуляции энтеровирусов в г. Екатеринбурге (1992-2005гг.) / Л. Г. Беседина, Н. С. Субботина, Н. Н. Сбитнева, Я. Б. Бейкин // Уральский медицинский журнал. – 2006. Спецвыпуск: «Микробиология». Ноябрь, -С.19-22

11. Бессергенева И. К. Тенденция эпидемического процесса неполиомиелитных энтеровирусных заболеваний в условиях мегаполиса / И. К. Бессергенева, Г. Д. Несговорова, А. В. Слободенюк, В. К. Слободенюк // Здоровье и среда обитания. - 2010. - № 6 (207). – С. 25-28.

12. Бичурина М.А. Роль энтеровируса ЕСНО 30 в этиологии энтеровирусной инфекции на Северо-Западе России в 2013 г. / М.А. Бичурина, Н.И. Романенкова, Л.Н. Голицына, Н.Р. Розаева, О.И. Канаева, С.Г. Фомина, Т.И. Крайнова, Л.А. Шишко, Т.А. Гордиенко, В.А. Пьяных, Т.Г. Иванова, С.Н. Смелков, М.В. Лесникова, Н.А. Новикова // Журнал инфектологии. – 2014. - №3 (Том 6). – С. 84-91.

13. Бичурина М.А. Сезонный подъем заболеваемости энтеровирусным менингитом в Новгородской области / М.А. Бичурина, В.А. Пьяных, Н.А. Новикова, Н.П. Леонова, Г.А. Клевцова, Н.И. Романенкова, Т.Г. Иванова, Л.Н. Голицына, Л.Б. Фомина, Н.Р. Розаева, О.Е. Цейц, Л.Б. Луковникова, О.И. Канаева, Н.В. Елифанова // Инфекция и иммунитет. – 2012. - №4. – С. 747-752.

14. Власова Л.В., Закирова С.Ф., Пацук Н.В., Иванова Л.М., Балакирева Р.Г., Сиротина Н.В., Ошерович А.М. // Свердловск, 1987.-25 С.

15. Ворошилова М.К. Иммунология, эпидемиология и профилактика полиомиелита и сходных с ним заболеваний.-1966.- Москва.- Медицина.-439 С.

16. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека. М.: Медицина,1979. 360 с.

17. Ворошилова М.К., Жевандрова В.И., Грачева Л.А., Петрова Г.А., Клячко Н.С., Шейнберг Т.П., Хазова М.Я., Куслап Т.Р., Мильнер В.И., Хиниц А.А., Марченко А.А., Златковская Н.М., Аталиева С.Г., Сергиенко А.Д., Турчина Т.М., Таранюк З.Е., Бабаев А.А., Слонова Р.А., Фельдман Э.В., Трофимова Л.И., Евдошенко В.Г., Пирцхалайшвили О.Г. Распределение вирусов среди здоровых детей в СССР в 1965-1966 гг. и их роль в этиологии болезней: материалы / Проблемная комиссия АМН СССР «Полиомиелит и вирусные энцефалиты», Выпуск 1, «Энтеровирусы». М., 1967. С. 32-33.

18. Ворошилова М.К., Жевандрова В.И., Королева Г.А., Дроздов С.Г., Петрова Г.А., Казанцева В.А., Ашмарина Е.Е., Андреева Л.С., Котлярова Х.С., Родштейн О.А., Бочкова А.К., Шейнберг Т.П., Турчина Т.М., Таранюк З.Е., Беляева Т.Н., Куслап Т.Р., Костина К.А., Слонова Р.А., Фельдман Э.В., Кардаш И.Б., Вотяков В.И., Евдошенко В.Г., Швецкая Б.Д. Распределение энтеровирусов среди детского населения СССР в 1962-1964 гг. (Москва, 19-22 октября 1965 г.) // Материалы XII

научной сессии ИПВЭ «Актуальные проблемы вирусных инфекций». М., 1965. С. 55-56.

19. Гаврилов Т. А. Анализ заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Иркутской области / Т. А. Гаврилов, Т. С. Прокопчук, Н. И. Лопина, Л. П. Нурсянова, В. И. Резник // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2002; 1. С. - 103-107.

20. Гаврилова Т. А. Анализ заболеваемости энтеровирусной инфекцией и пейзажа циркулирующих энтеровирусов на территории иркутской области / Т. А. Гаврилова, А. В. Севостьянова, Л. П. Нурсаянова, М. Д. Бибаева, М. И. Хакимова, В. Б. Казанова, М. М. Верховина, Т. И. Борисова, Е. И. Андаев // Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения РФ: Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. - Москва: Издательство НИИЭМ Имени Пастера. - 2012. - с.527.

21. Голицына Л. Н. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России / Л. Н. Голицына, В. В. Зверев, О. В. Парфенова, Н. А. Новикова // Медицинский альманах. – 2015. - № 5 (40). – С. 136-140.

22. Голицына Л.Н. Неполиомиелитные энтеровирусы, идентифицированные у больных с различной формой энтеровирусной инфекции / Л.Н. Голицына, С.Г. Фомина, О.В. Парфенова, Н.В. Епифанова, В.В. Зверев, Л.Б. Луковникова, О.В. Морозова, Т.А. Сашина, Л.Л. Климова, А.В. Семенова, Н.А. Калашникова, Н.А. Новикова // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», Москва, 12-13 апреля 2012 г. - М. - 2012. - Т. 2. - С. 527.

23. Голицына Л.Н. Энтеровирусы в Российской Федерации в 2007-2015 гг. / Л. Н. Голицына, В. В. зверев, Н. А. Новикова // Сборник

материалов научно-практической конференции "Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе" - Новосибирск, - 26-27 сентября 2016 г. – С. 27-30.

24. Голицына, Л.Н. Молекулярная характеристика эпидемического варианта вируса ЕСНО30-2013 / Л.Н. Голицына и [др.] // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» / под ред. В.И. Покровского. – М., 2014. – Т.1. – С. 416–417.

25. Григорьева Л. В. Санитарная бактериология и вирусология водоемов / Л. В. Григорьева // Москва., Медицина. – 1975. - 192 с.

26. Григорьева Л. В. Энтеровирусы во внешней среде / Л. В. Григорьева // Медицина. - 1968. – С. 288.

27. Демиденко А.Д. Энтеровирусы у детей первого года жизни: сб. науч. тр. / ИПВЭ АМН СССР. Энтеровирусные инфекции. Т. XIV. М., 1970. С. 156- 159.

28. Демина А. В. Энтеровирусы. Часть 1: История открытия, таксономия, строение генома, эпидемиология / А.В. Демина, Н.А. Маркович, С.В. Нетесов // Бюллетень СО РАМН. - 2008. - № 1(129). – С. 92-100.

29. Демина А.В. Вспышка острой кишечной инфекции энтеровирусной этиологии в Сахалинской области в августе 2010 года А.В. Демина, В.А. Терновой, Б.Б. Дарижапов, Т.В. Якубич, А.О. Семенцова, О.К. Демина, Е.В. Протопопова, В.Б. Локтев, А.П. Агафонов, С.В. Нетесов // Вестник РАМН. – 2012. - № 2. - С. 64-68.

30. Ежлова Е. Б. Итоги реализации программы «эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции» / Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, М. И. Казинова, Н. С. Морозова, О. П. Чернявская // Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации:

тез. докл. Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – Москва, 2012. – С.528

31. Ешмолов С. Н. Клинико-эпидемиологические и иммунологические особенности энтеровирусных менингитов у детей в Ярославской области/ С. Н. Ешмолов, И. Г. Ситников, И. М. Мельникова // Детские инфекции. – 2012. - №. С. – 17-20

32. Жевандрова В.И. Дальнейшие наблюдения по кишечному носительству полиовирусов и неполиомиелитных цитопатогенных энтеровирусов среди здоровых детей в г. Москве / В. И. Жевандрова, М. К. Ворошилова, Л. А. Грачева // сб. науч. тр. Труды ИПВЭ АМН СССР. Полиомиелит и другие энтеровирусные инфекции. - М.: Медицина. - 1965. - Т. VI. - С. 220-229.

33. Жукова Л. И. Энтеровирусные неполиомиелитные инфекции в Краснодарском крае / Л. И. Жукова, Г. К. Рафеенко, Ф. И. Ларин, Л. И. Щербина, И. Н. Щунь, М. А. Давыдова, А. А. Ванюков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2014. - №4. - С. 13-17

34. Златковская Н. М. Энтеровирусные заболевания у детей / Н. М. Златковская. - М.: Медицина, -1976. - 192 с.

35. Иванова О. Е. Вирусологическая и клинико-эпидемиологическая характеристика серозных менингитов в Москве (2008-2012гг.) / О. И. Иванова, Т. П. Еремеева, А. Н. Лукашев, и др // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2014г. - №3 (76). - С. 10-17.

36. Иванова О. Е. Исследование сточных вод в доме ребенка как подход к надзору за циркуляцией полиовирусов / О. Е. Иванова, Т. П. Еремеева, О. Ю. Байкова // Журнал Микробиологии – 2009. - №1. – С. 12-16.

37. Канаева О. И. Использование методов молекулярной диагностики в надзоре за энтеровирусной инфекцией / О.И. Канаева, Н. И. Романенкова, Н. Р. Розаева, М. -L. Joffret, F. Delpeyroux, М. А.

Бичурина // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора "Современные проблемы эпидемиологии и гигиены" - Москва, 1–3 ноября 2016 г. - С. 97-98.

38. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм / О. И. Канаева // Инфекция и иммунитет. – 2014. - № 1(Т. 4). - С. 27–36

39. Киселева Л. В. Некоторые данные о циркуляции энтеровирусов в Мурманской области в 1967-1969 гг. / Л. В. Киселева, В. Я. Михайлова, Т. С. Воронова // Энтеровирусные инфекции: сб. науч. тр. / ЛНИИЭМ им. Пастера. - Л., 1971. - Т. XXXVIII. - С. 103- 108.

40. Клячко Н. С. Лабораторная диагностика спорадических серозных менингитов, вызываемых энтеровирусами: Метод. указания / М-во здравоохранения РСФСР. Ленингр. науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. На обороте тит. л.: сост. Н. С. Клячко, Н. В. Галко, Т. П. Шейнберг – Ленинград, 1971. - 33 С.

41. Кожевникова Н. В. Использование метода ПЦР для изучения циркуляции энтеровирусов среди населения Хабаровского края в период повышенной заболеваемости СВМ в 2007 г. / Н. В. Кожевникова, В. И. Резник, Г. М. Воронкова, Л. А. Балахонцева, М. А. Перескокова, Е. М. Голубева Т. М. Каравянская, Л. В. Савосина, А. Н. Лукашов, О. Е. Иванова, О. Е. Троценко // сб. науч. тр. 6-ая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007». М., 2007. Т. III. С. 257-259.

42. Кожевникова Н.В. Использование метода ПЦР для изучения циркуляции энтеровирусов среди населения Хабаровского края в период повышенной заболеваемости СВМ в 2007 г. / Н. В. Кожевникова, В. И. Резник, Г. М. Воронкова // 6-ая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007»: сб. науч. тр. / М., 2007. - Т. III. - С. 257-259.

43. Кожевникова Н.В. Проявления эпидемического процесса энтеровирусных инфекций в дальневосточном федеральном округе / Н.В. Кожевникова, В.И. Резник, Г.М. Воронкова, В.А. Отт, Т.Н. Каравянская, М.А. Перескокова, Е.М. Голубева, Л.А. Балахонцева, В.О. Котова, В.В. Фоменко, О.Е. Троценко, Б.Б. Дарижапов, Н.В. Зарайченкова, Г.Б. Лебедев, Д.В. Маслов, А.П. Протодьяконов, В.Р. Саухат, В.Т. Смирнов, В.А. Янович // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. – 2008. - №13 – С. 9-7

44. Лашкевич В.А. Острый энтеровирусный увеит у детей раннего возраста / Лашкевич В.А., Королева Г. А., Лукашев А. Н и соавт. // Вопросы вирусологии. -2005. -Т.50, №3. -С.36-45.

45. Лесников Н. Т. Организация мониторинга за циркуляцией полио/энтеровирусов в Забайкальском крае / Н. Т. Лесников, Л. Г. Днепровская, Е. В. Емакова, О. П. Бондарева, // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов "Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации". Москва 12-13 апреля 2012. - Т.2. - №1-2.

46. Лукашев А. Н. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО30 на территории России и стран СНГ / А. Н. Лукашев, О. Е. Иванова, Т. П. Еремеева, В. А. Лашкевич, К. Е. Черненко // Вопросы вирусологии. – 2004. – Том 49, №5. – С. 12-16.)

47. Лукашев А.Н. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 6 — возбудителя вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. / Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е. и соавт. // Вопросы вирусологии. -2008. -Т.53, №1. -С.16-21.

48. Макарова Т.Е. К вопросу о диагностике серозно-вирусного менингита энтеровирусной этиологии у детей / Т.Е. Макарова, Г.В. Савосина, С.В. Константинов, Т.А. Горбатко, Н.И. Отводникова, Т.А.

Капура, С.С. Чевозеров // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2008. - №12. – С. 27-29.

49. Маурина Е. А. Мониторинг энтеровирусов в Северо-Западном регионе России / Е. А. Маурина // Детские инфекции. - 2006. - №1. – С. 2-11.

50. Модестова Н.В. Результаты вирусологического обследования населения Северного и Среднего Урала / Н. В. Модестова, Л. В. Власова, Н. В. Пацук, Н. Я. Венедиктова, А. С. Курсакова, В. Н. Стрельцова, П. М. Утницкая, В. Е. Пиретинская, Л. А. Лемясева // Энтеровирусные инфекции: сб. науч. тр. / ИПВЭ АМН СССР. - М., 1970. - Т. XIV. - С. 128-131.

51. Морозова А.В. Материалы к изучению циркуляции энтеровирусов и иммунологические показатели к ним в крови здорового детского населения Калининграда в 1968-69 гг. / А. В. Морозова, В. В. Лезина // Энтеровирусные инфекции: сб. науч. тр. / ЛНИИЭМ им. Пастера. - Л., 1971. - Т. XXXVIII. - С. 93-102.

52. Му 3.1.1.2130-06 методические указания 3.1.1. Профилактика инфекционных заболеваний. Кишечные инфекции энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика

53. Му 3.1.1.2363-08 эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции Методические указания

54. Мук 4.2.2029-05 методические указания 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы Санитарно-вирусологический контроль водных объектов

55. Никонов Б. И. Особенности энтеровирусных инфекций на территории Свердловской области в эпидсезон 2005-2006гг / Б. Н. Никонов, В. В. Романенко, А. И. Юровских, С. В. Скрыбина, Т. Э. Снитковская // Уральский медицинский журнал. – 2006. – 2. – С. 29-32.



56. Новикова Н. А. Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции / Н.А. Новикова, Л.Н. Голицына, В.В. Зверев // Информационный бюллетень. – 2015. - №2. – С. 3-4.

57. Новикова Н. А. Молекулярный мониторинг за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов на территории России (2008-20015гг.) / Н. А. Новикова, Л. Н. Голицына, В. В. Зверев, Н. В. Епифанова, А. Ю. Кашников, Т. А. Сашина, О. В. Морозова // Медицинская вирусология. – 2015. - №2 (Том XXIX). – С. 110.

58. Новикова Н.А. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на территории России в 2008–2011 гг. / Н. А. Новикова, Л. Н. Голицына, С. Г. Фомитна, Е. И. Ефимов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2013. – № 1. – С. 75–78.

59. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад.—М.:Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015.—206 с.

60. Оленькова О. М. Диагностика энтеровирусных инфекций у детей г. Екатеринбурга / О. М. Оленькова, О. П. Ковтун, А. У. Сабитов, Н. С. Субботина, Н. Н. Сбитнева, Я. Б. Бейкин // Уральский медицинский журнал. – 2011. - № 13 (91). - С. 14-18.

61. Оленькова О. М. Энтеровирусные менингиты у детей: оценка эпидемиологической значимости, особенности диагностики и клинического течения / Оленькова О. М., Ковтун О. П., Бейкин Я. Б., Лагерева Ю. Г., Сбитнева Н. Н., Павленко Т. П. // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2014. - № 1. - С. 18-22.

62. Онищенко Г. Г. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Нижнем Новгороде в 2007 году: молекулярно-эпидемиологические аспекты / Г. Г. Онищенко, Н. А. Новикова, Е. И. Ефимов, О. Н. Княгина и

др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – №2. – С. 24-30

63. Ошерович А. М. Некоторые результаты санитарно-вирусологического обследования объектов внешней среды / А. М. Ошерович, Г. С Часовникова // Гигиена и санитария. – 1969. - №3, - с. 79—83.

64. Пархоменко В. В. Эпидемиологический надзор за (неполио) энтеровирусами на территории Краснодарского края за 2002-2009гг. В.В. Пархоменко, Г.К. Рафеенко, И.Н. Шуть ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» <http://www.cgekuban.ru/publication/epid/enterovir.php>

65. Перескокова М. А. Роль санитарно-вирусологических исследований сточных вод для оценки эпидситуации по энтеровирусным инфекциям / М. А. Перескокова, В. И. Резник, Л. А. Лебедева, Л. В. Савосина, Н. В. Исаева // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2008. - №12. - С. 15-26.

66. Перескокова М.А. Характеристика сточных вод, как индикатора циркуляции вирусов среди населения / М.А. Перескокова, В.И. Резник, Н.В. Исаева, И.В. Скопинок, В.А. Шмелева, Л.В. Савосина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2006. - № 8. - С. 75-80.

67. Петрова И. С. Особенности течения энтеровирусных инфекций с менингитом у взрослых в эпидемическом сезоне 2013 года / И. С. Петрова, А. С. Шишов, М. В. Базарова, С. А. Русанова, О. А. Бургасова, И. А. Бланк, В. Г. Лева, Е. Н. Шуренкова, Е. В. Москалева // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. - № 3. С. 15-21

68. Ползик Т.П. Циркуляция неполиомиелитных цитопатогенных энтеровирусов среди здорового детского населения Ленинграда в 1964-68 гг.: сб. науч. тр. / ЛНИИЭМ им. Пастера. Энтеровирусные инфекции. Л., 1971. Т. XXXVIII. С. 58-75.

69. Программа "Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции на 2015 - 2017 гг."

70. Проскурякова Н. Б. К вопросу о выделении вирусов из фекалий у здоровых людей / Н. Б. Проскурякова // Вопросы вирусологии. – 1969. - №3. - С. 356-360.

71. Резник В. И. Эпидемиологическая и этиологическая характеристика энтеровирусных инфекций в Хабаровском крае / В. И. Резник, Н. В. Кожевникова, Т. Н. Каравянская, Г. М. Воронкова и соавт. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2007. - №5. - С. 32-37.

72. Резник В.И. Этиология серозно-вирусного менингита в Хабаровском крае в 2005-2006 г.г. / В.И. Резник, М.А. Перескокова, Л.А. Лебедева, Л.В. Савосина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2008. - №12. – С. 10-14.

73. Резник В.И., Забавникова Г.А., Рослая И.Г., Афанасиано Г.Н. Выделение энтеровирусов у населения Хабаровского края и изучение его иммунологической структуры: сб. науч. тр. / ИПВЭ АМН СССР. Энтеровирусные инфекции. М., 1970. Т. XIV. С. 181-186.

74. Романенкова Н. И. Надзор за полиомиелитом и энтеровирусными инфекциями на ряде территорий Российской Федерации / Н. И. Романенкова, М. А. Бичурина, Н. Р. Розаева // Журнал микробиологии, вирусологии и иммунологии. - 2011. №6. - С. 32-26

75. Романенкова Н. И. Роль эпидемиологического надзора за мигрантами в системе надзора за полиомиелитом / Н. И. Романенкова, М. А. Бичурина, Н. Р. Розаева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. - №6. - С. 27-31.

76. Романенкова Н.И. Детекция неполиомиелитных энтеровирусов у детей с острыми вялыми параличами из организованных коллективов и семей мигрантов / Н. И. Романенкова,

О.И. Канаева, М.А. Бичурина, Н.Р. Розаева // Журнал инфектологии. - 2014. - №4 (Том 6). - С. 43-48

77. Сейбиль В. Б. Серозный менингит / В. Б. Сейбиль, Т. И. Фролочкина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - N1. - С. 87-92.

78. Сняк Л. И., Приходько Е. Ф., Столетняя М. В., Циркуляция энтеровирусов среди детей дошкольных учреждений Украинской ССР (1987-1989гг.) // Материалы всесоюзной конференции «Энтеровирусы. Общетеоретические и медицинские аспекты» (г. Киев, март 1991г.) С. 89-90.)

79. Скачков М. В. Клинико-эпидемиологические аспекты энтеровирусных менингитов у детей г. Оренбурга / М. В. Скачков, Н. Б. Денисюк // Детские инфекции. – 2011. – С. 60-63.

80. Слободенюк В. К. Изменения в динамике заболеваемости и вирусывыделения при эпидемическом процессе энтеровирусного менингита по материалам Екатеринбурга за 1965-2000 гг. / В. К. Слободенюк, Н. П. Глинских, Н. Ю. Пономаренко // Вопросы вирусологии. – 2002. - № 3. - С. 48.

81. Снитковская Т. Э. Роль унифицированной системы вирусологического мониторинга в эпидемиологическом надзоре за полиомиелитом и энтеровирусными инфекциями в крупном промышленном регионе : автореферат диссертации кандидата медицинских наук: 03.02.02: защищена 13.11.2013 / Снитковская Татьяна Эдуардовна, ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П.Чумакова» РАМН. – М., 2013. – 24с.

82. Снитковская Т. Э. Характеристика энтеровирусных инфекций в Свердловской области / Т. Э. Снитковская, С. В. Скрябина // Уральский медицинский журнал. – 2008. - №8(48). - С.146-149.

83. СП 3.1.2950-11 "Профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции

84. Тамм О. М. Применение живой полиомиелитной вакцины и циркуляции энтеровирусов в Эстонской ССР в 1965-1970 гг. / О. М. Тамм, Т. Р. Куслат, К. К. Кутсар // Журн. микробиол. – 1973. - № 7. - с. 76-81.

85. Таранюк З. Е. Носительство цитопатогенных энтеровирусов у детей младшего возраста // Материалы проблемной комиссии АМН СССР. Полиомиелит и вирусные энцефалиты М. 1967г. С. 107-108.

86. Таранюк З. Е. Носительство цитопатогенных энтеровирусов у детей младшего возраста / З. Е. Таранюк, Т. М. Турчина // АМН СССР «Полиомиелит и вирусные энцефалиты»: материалы Проблемной комиссии, Выпуск 1, «Энтеровирусы». - М. - 1967. - С. 106-108.

87. Тарасенко Т. О вспышке энтеровирусной инфекции во Владивостоке / Т. Тарасенко, Е.В. Косенок, А.В. Каленик, Г.Т. Дзюба // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2009. - №3. – С. 81-83.

88. Троценко О. Е. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции энтеровирусов на Дальнем Востоке и в Забайкалье /О. Е. Троценко, А. Н. Лукашев, Т. Н. Каравянская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2013г. - №1. - С. 70-75.

89. Троценко О. Е. Организация молекулярно-эпидемиологического мониторинга энтеровирусных инфекций в дальневосточном ФО РФ / О.Е. Троценко, А.Н. Лукашев, Е.Ю. Сапега, В.И. Резник, Т.Н. Каравянская, В.О. Котова, Л.А. Балахонцева, Л.В. Худякова, Е.Н. Амяга, П.В. Корита // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2011. - №19. - С. 5 – 12.

90. Троценко О.Е. Многолетний анализ проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в хабаровском крае и основные факторы, определяющие ухудшение эпидемиологической ситуации в условиях наводнения / О.Е.Троценко, Т.Н.Каравянская,

В.А.Отт, Г.Г.Онищенко и др. // Проблемы особо опасных инфекций. 2014. - № 1. - С. 75-78.

91. Троценко О.Е. Научно-методические основы организации молекулярно-эпидемиологического мониторинга энтеровирусных инфекций в Дальневосточном ФО РФ / О. Е. Троценко, А.Н. Лукашев, Е.Ю. Сапега, В.И. Резник, Т.Н. Каравянская, В.О. Котова, Л.А. Балахонцева, Е.Н. Амяга, Т.В. Корита // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. - 2011. - № 19. - С. 5—12.

92. Утницкая О. С. Вирусологические, серологические и эпидемиологические особенности серозного менингита в условиях областного центра и городов районного масштаба: автореферат дис. кандидата мед. Наук: 03.00.06: защищена 20.03.92 / Утницкая Ольга Станиславовна; Свердлов. Науч.-иссл. Инстит. Вирус. Инфекций Мин. Здравоохранения РСФСР. – М., 1991. – 20с.

93. Фалькова И.И. Энтеровирусы у детей (опыт систематических исследований в детских коллективах)//Автореферат дисс., 1962, 15 С.;

94. Фисенко Е. Г. Особенности проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Минске / Е. Г. Фисенко, Т. В. Авросьева, Н. В. Поклонская, А. А. Безручко // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2007. - №2. - С. 8-11.

95. Фомина С. Г. Анализ циркуляции энтеровирусов среди детей с гастроэнтеритом / С. Г. Фомина, Л. Н. Голицына, Л. Б. Луковникова, Н. В. Епифанова, О. В. Парфенова, Н. А. Новикова // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным заболеваниям, Москва, 29-31 марта 2010 г. - М. - 2010. - С. 342.

96. Фомина С. Г. Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде / С.Г. Фомина, Л.Н. Голицына, Н.А. Новикова и др // Медицинский альманах. - 2009. - №2 (7). - С. 121-123.

97. Фомина С. Г. Энтеровирусы у детей с гастроэнтеритом / С. Г. Фомина, Н. А. Новикова // Медиаль. - 2014. - №2 (12). - С. 58-71

98. Фомина С.Г. Видовое разнообразие энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде / С.Г. Фомина, Л.Н. Голицына, Н.В. Елифанова, О.В. Парфенова, Н.А. Новикова // Материалы научно-практической конференции научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире», п. Оболенск, Московская обл., 21-22 апреля 2009 г. – Оболенск. - 2009. - С 74-76.

99. Фомина С.Г. Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов вида С / С.Г. Фомина // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения», Пермь, 16-18 мая 2012 г. – Пермь. - 2012. - Т. II. - С. 269-273.

100. Фомина С.Г. Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде / С.Г. Фомина, Л.Н.Голицына, Н.А. Новикова, Н.В. Елифанова, Л.Б. Луковникова, О.В. Парфенова // Медицинский Альманах. – 2009. - №2. – С. 121-123.

101. Фомина С.Г. Мониторинг циркуляции энтеровирусов среди детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде в 2006-2010гг. / С.Г. Фомина,Н.А. Новикова // Медицинский альманах. - 2011. - № 4. - С. 28-29.

102. Фомина С.Г. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей участка гена VP1 и фрагмента 5'-НТР генома вирусов ЕСНО 30, выделенных от больных серозным менингитом и гастроэнтеритом / С.Г. Фомина, Л.Н. Голицына, О.В. Парфенова, Н.А. Новикова // Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов «Современные технологии

обеспечения биологической безопасности», п. Оболенск, Московская обл., 25-27 мая 2010 г. – Оболенск. - 2010. - С. 308-310.

103. Фомина С.Г. Энтеровирусы у детей с острой кишечной инфекцией / С.Г. Фомина, Л.Б. Луковникова, Н.В. Епифанова, Л.Н. Голицына, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», Москва, 12-13 апреля 2012 г. - М. - 2012. - Т. 2. - С. 334.;

104. Фомина С.Г. Энтеровирусы у детей с острой кишечной инфекцией: молекулярно-эпидемиологические аспекты / С.Г. Фомина, Н.А. Новикова // Инфекционные болезни. - 2012. - Т. 10, № 4. - С. 12-18; Фомина С.Г. Пейзаж энтеровирусов у детей с острой кишечной инфекцией//Автореф. дисс. канд., М., 2012.-28 С.

105. Хотько Н. И. Водный фактор в передачи инфекции / Н. И. Хотько, А. П. Дмитриев. - Пенза. - 2002. - 232с.

106. Шаханина И. Л. Задачи эпидемиологического надзора в системе социально-гигиенического мониторинга / И. Л. Шаханина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. - №2. – С. 4-6.

107. Шейнберг Т.П. Циркуляция неполиомиелитных цитопатогенных энтеровирусов в Ленинграде по данным вирусологического и иммунологического обследования здоровых детей, не посещающих детские учреждения: сб. науч. тр. / ИПВЭ АМН СССР. Энтеровирусные инфекции. М., 1970. Т. XIV. С. 166-174.

108. Шишко Л.А. Этиология сезонных подъемов заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Архангельской области / Л.А. Шишко, Н.И. Романенкова, М.А. Бичурина, Т.А. Гордиенко, Н.Р. Розаева, Л.Н. Голицына, Л.Б. Фомина, О.И. Канаева, Л.В. Лялина, Н.А. Новикова // Инфекция и иммунитет. –2013 – №1,Т. 3. – С. 65–72.



109. Энтеновирусные инфекции : руководство для врачей. – М., 2012. – 432 с.

110. Энтеновирусы в 2006 -2008 году в соединенных штатах америки. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5948a2.htm>

111. Ющук Н. Д. Лекции по инфекционным болезням. / Н. Д. Ющук, Ю. Я. Венгеров. - М. : ВУНМЦ, 1999. – 1032 с.

112. Ярмольская М. С. Молекулярная эпидемиология ЕСНО вирус ЕСНО 11 И 30: эпидемиологические и биологические различия генотипов в пределах одного серотипа / М. С. Ярмольская, Е.Ю. Шумилина, О.Ю.Байкова, О.Е.Иванова, А.Н.Лукашев Молекулярная диагностика- 2014. Сб.трудов // колл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1 – М.: ООО "Издательство МБА". - 2014. – 560 с.

113. Abe O. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan / O. Abe, H. Kimura, H. Minakami // J. Infect. - 2000. - V. 41, № 3. - P. 285-286.

114. Akerblom H.K. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes / H. K. Akerblom , O. Vaarala, H. Hyoty , J. Ilonen, M. Knip // Am. J. Med. Genet. - 2002. - №115(1). - P. 18-29.

115. Arola A. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis / Arola A., Santti J., Ruuskanen O., Halonen P., Hyypia T. // Journal of Clinical Microbiology. -1996. –Vol.34. – P.313-318.

116. Bailly J. L. Nosocomial Transmission of Echovirus 30: Molecular Evidence by Phylogenetic Analysis of the VP1 Encoding Sequence / J. L. Bailly, A. Beguet, M. Chamabon, C. Henquell, H. Peigue-Lafeuille // Journal of clinical microbiology. – 2000. - Vol. 38, No. 8. – P. 2889–2892.

117. Bailly J. L. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: Nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene / J. L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell, C. Archimbaud, M. Chambon, F. Charbonner, O. Traorer, H.

Peigue-Lafeuille // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2009. - №9. – P. 699–708.

118. Bailly J. L. Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes / J. L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell, C. Archimbaud, M. Chambon, C. Regagnon, F. Charbonne, H. Peigue-Lafeuille // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2011. -11. - P.276–289.

119. Bingjun T. Molecular Typing and Epidemiology of Non-Polio Enteroviruses Isolated From Yunnan Province, the People's Republic of China / T. Bingjun, H.Yoshida, W. Yan, L. Lin, T.Tsuji, H.Shimizu, T. Miyamura // *Journal of Medical Virology*. – 2008. - №80. – P.670–679.

120. Cabrerizo M., Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006 / M. Cabrerizo, J.E. Echevarria, I. González, T. de Miguel, G. Trallero // *J. Med Virol*. – 2008. -№80(6). – P.1018-1024.

121. Casas I. 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 / I. Casas, G. F. Palacios, G. Trallero, D Cisterna, M. C. Freire, A. Tenorio // *Journal of Medical Virology*. –2001. – Vol.65. – P. 138-148.

122. CDC Centers for Disease Control and Prevention Nonpolio Enterovirus and Human Parechovirus Surveillance — United States, 2006–2008. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2010. - Vol.59. - P. 1577-1580.

123. CDC Echovirus 13 activity - United States, 2001 // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. -2001. –Vol.50. – P. 777-780.

124. CDC Outbreaks of Aseptic Meningitis Associated with Echoviruses 9 and 30 and Preliminary Surveillance Reports on Enterovirus

Activity — United States, 2003 // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2003. - Vol.52. – P. 761-764.

125. Chang K. H. The nucleotide sequence of coxsackievirus A9; implications for receptor binding and enterovirus classification. / K. H. Chang, P. Auvinen, T. Hyypiä, G. Stanway // *J. gen virol.* – 1989. - Dec;70 (pt 12). – P. 3269-80.

126. Chen P. A. Coxsackievirus B5-Associated Aseptic Meningitis Outbreak in Shandong Province, China in 2009 / P. Chen, Z. Tao, Y. Song, G. Liu, H. Wang, Y. Liu, L. Song, Y. Li, X. Lin, N. Cui, A. Xu // *Journal of Medical Virology*. – 2013. – №85. - P.483–489.

127. Chomel J. J. Three ECHO virus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France / J. J. Chomel, D. Antona, D. Thouvenot, B. Lina // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 22, №3. – P. 191-193.

128. Christensen A. Enterovirus infections diagnosed in middle Norway during the period 1992-2001 / A. Christensen, S.A. Nordb // *Tidsskr Nor Laegeforen* [Article in Norwegian] 2003. - Nov 20;123(22). - P. 3180-3383.

129. Dalwai A. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait / A. Dalwai, S. Ahmad, W. Al-Nakib // *Virology Journal*. – 2010. – №7. – P.236. <http://www.virologyj.com/content/7/1/236>

130. Domingo E. Basic concepts in RNA virus evolution / E. Domingo et al // *Faseb. J.* – 1996. – № 10. – P. 859–864.

131. Fares W. Phylogenetic analysis of complete VP1 sequences of echoviruses 11 and 6: high genetic diversity and circulation of genotypes with a wide geographical and temporal range / W. Fares, D. Rezig, M. Seghier, A. Ben Yahia, H. Touzi, H. Triki // *Journal of Medical Microbiology*. – 2011. - №60. – P.1017–1025.

132. Foliquet J.M. La Pollution Virale des. Eaux Usees, de Surface et d'Alimenta- tion. Bull. / J.M. Foliquet, L. Schwartzbrod, O.G. Gaudin. // Org. Mond. San te. -1966. – 35. – P 737.

133. Gullberg M. Characterization of a Putative Ancestor of Coxsackievirus B5 / M. Gullberg, C. Tolf, N. Jonsson, M. N. Mulders, C. Savolainen-Kopra, T. Hovi, M. Van Ranst, Ph. Lemey, S. Hafenstein, A. M. Lindberg // Journal of virology. – 2010. - №84(19). - P. 9695–9708.

134. Henquell C. Phylogenetic Patterns of Human Coxsackievirus B5 Arise from Population Dynamics between Two Genogroups and Reveal Evolutionary Factors of Molecular Adaptation and Transmission / C. Henquell, A. Mirand, J. Richter, I. Schuffenecker, B.Bottiger, S. Diedrich, E. Terletskaia-Ladwig, C. Christodoulou, H. Peigue-Lafeuille, J.-L. Baillya // Journal of Virology. – 2013. – Vol. 87, №22. – P. 12249–12259.

135. Hovi T. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond / T. Hovi, L. M. Shulman, van der H. Avoort, J. Deshpande, M. Roivainen, E. M. DE Gourville // Epidemiol Infect. – 2012. – № 140(1). – P. 1-13.

136. Hyypia T. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties / Hyypia T., Hovi T., Knowles N.J., Stanway G. // Journal of General Virology. - 1997. - 78 (Pt 1). - P.1-11.

137. Kelly S.M., Sanderson W.W. 1959 Sewage Ind. Waster 31:683

138. Kelly S.M., Winsser J. Winkelstein W. 1957 Am. J. Public Health 47:72

139. Khetsuriani N. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005 / N. Khetsuriani, A. Lamonte-Fowlkes, S. Oberste, et al. // MMWR Surveill Summ. – 2006. – Vol. 55. – P. 1-20.

140. Kim H. J. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008 / H.-J. Kim, B. Kang, S. Hwang, J. Hong, K. Kim, D.S. Cheon // Virology Journal. – 2012. - 9:38  
<http://www.virologyj.com/content/9/1/38>

141. Kitahori Y. An epidemic of aseptic meningitis due to coxsackievirus B5 in Nara prefecture, Japan: an epidemiological analysis by PCR-RFLP / Y. Kitahori, Y. Inoue, Y. Maruhashi, O. Adachi, S. Imai. // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2003. - №56. – P. 75–76.

142. Kling C. Sewage as a carrier and disseminator of poliomyelitis virus. I. Searching for poliomyelitis virus in Stockholm sewage. II. Studies on the conditions of life of poliomyelitis virus outside the human organism / C. Kling, G. Olin, J. Fahraeus et al. // *Acta Med Scand.* - 1942. - 112:217 -49. - P. 250-63.

143. Kyriakopoulou Z. Genome analysis of two type 6 echovirus (E6) strains recovered from sewage specimens in Greece in 2006 / Z. Kyriakopoulou, V. Pliaka, D. Tsakogiannis, I. G. A. Ruether, D. Komiotis, C. Gartzonika, S. Levidiotou-Stefanou, P. Markoulatos // *Virus Genes.* - 2012. - №44. – P.207–216.

144. Ladasky J. J. Residue 3 of beta2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody / J.J. Ladasky, B.P. Shum, F. Canavez, H.N. Seuanez, P. Parham // *Immunogenetics.* - 1999. - Vol.49(4). – P. 312 – 320.

145. Lindberg A. M. Molecular analysis of the prototype Coxsackievirus B5 genome / A. M. Lindberg, C. Polacek // *Arch Virol.* – 2000. - №145. – P. 205–221.

146. Liu N. An outbreak of aseptic meningitis caused by a distinct lineage of coxsackievirus B5 in China / N. Liu, L. Jia, J. Yin, Z. Wu1, Z. Wang, P. Li, R. Hao, L.Wang, Y. Wang, S. Qiu, H. Song // *International Journal of Infectious Diseases.* – 2014. - №23. – P. 101–104.

147. Lodder W. J. Feasibility of Quantitative Environmental Surveillance in Poliovirus Eradication Strategies / W. J. Lodder, A. M. Buisman, S. A. Rutjes, J. C. Heijne, P. F. Teunis, A. M. de Roda Husmana // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2012. - Volume 78 Number 11. - P. 3800–3805.

148. Lukashev A. N. Molecular epidemiology of the ECHO 30 virus in Russia and CIS countries / A. N. Lukashev, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, V. A. Lashkevich, K. E. Chernenko // *Vopr. Virusol.* - 2004/ - Sep-Oct;49(5). - P. 12-6.

149. Lukashev A. N. Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions / A. N. Lukashev, Vasilii A. Lashkevich, O. E. Ivanova, G. A. Koroleva, A. E. Hinkkanen, J. Ilonen // *Journal of General Virology.* – 2005. – 86. - P. 3281–3290.

150. Lukashev A.N. Analysis of echovirus 30 isolates from Russia and new independent states revealing frequent recombination and reemergence of ancient lineages / A.N. Lukashev, O. E. Ivanova, T.P. Eremeeva, L.V. Gmyl // *J. Clin Microbiol.* - 2008. - Feb;46(2). - P. 665-70.

151. Ma H. Recombination in human coxsackievirus B5 strains that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan, China / H. Ma, X. Huang, K. Kang, X. Li, X. Tang, Y. Ren, Y. Wang, G. Zhao, B. Xu // *Arch Virol.* – 2013. - №1589(10). - P. 2169-2173.

152. Mao N. An Aseptic Meningitis Outbreak Caused by Echovirus 6 in Anhui Province China / N. Mao, L. Zhao, Z. Zhu, X. Chen, S. Zhou, Y. Zhang, A. Cui, Y. Ji, S. Xu, W. B. Xu // *Journal of Medical Virology.* – 2010. - №82. – P.441–445.

153. Melnick J. L. A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis / J. L. Melnick, E. W. Shaw, E. C. Curnen // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1949. - 71. - P. 344–349.

154. Melnick J. L. Development of Neutralizing Antibodies against the Three Types of Poliomyelitis Virus During an Epidemic Period. The Ratio of Inapparent Infection to Clinical Poliomyelitis. / J. L. Melnick, N. Ledinko // *Amer. Jour. Hyg.* - 1953. - 58. - P. 207.

155. Mirand A. Prospective Identification of Enteroviruses Involved in Meningitis in 2006 through Direct Genotyping in Cerebrospinal Fluid / A.

Mirand, C. Henquell, C. Archimbaud, M. Chambon, F. Charbonne, H. Peigue-Lafeuille, J.-L. Bailly // *Journal of clinical microbiology*. 2008. - №46 (1). – P. 87–96.

156. Miyoshi M. Genomic characterization of echovirus 6 causing aseptic meningitis in Hokkaido, Japan: a novel cluster in the nonstructural protein coding region of human enterovirus B / M. Miyoshi, R. Komagome, S. Ishida, H. Nagano, K. Takahashi, M. Okano // *Archives of Virology*. – 2013. - № 158. – P.775-784.

157. Nix W.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all Enterovirus serotypes from original clinical specimens. / W.A. Nix, M.S. Oberste, M. A. Pallansch // *J. of Clinical microbiology*. - 2006. - V. 44. № 8. - P. 2698-2704.

158. Oberste M. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences of the 5' and of the region encoding VP2. // M. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch. // *Virus. Res.* - 1998. - V. 58. - P. 35-43.

159. Oberste M.S. Evidence for frequent recombination within species Human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes / M.S. Oberste, K. Maher, M. A. Pallansch. // *J. Virol.* – 2004. – Vol.78(2). – P. 855–867.

160. Oberste M.S. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation // M.S. Oberste, K. Maher, M. L. Kennett, J. J. Campbell, M. S. Carpenter, D. Schnurr / *J. Clin. Microbiol.* – 1999. - №37. – P. 3928-3933.

161. Oprisan G. Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses / G. Oprisan, M. Combiescu, S. Guillot, V. Caro, A. Combiescu, F. Delpeyroux, R. Crainic // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 2193-2200.

162. Pabbaraju K. Genetic characterization of a Coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010 / K. Pabbaraju,

S. Wong, E. N Y Chan, R. Tellier // *Virology Journal*. – 2013. 10:93  
<http://www.virologyj.com/content/10/1/93>

163. Pallansch M. A. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. M.A.Pallansch, R.P. Roos *Fields' Virology*. (Ed. D.N. Knipe et al.) 5th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. - 2007. - P. 839–893.

164. Pallansch M. A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses // *Fields' Virology*. (Ed. Knipe D.N. and Howley P.M.) 4th Ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. 1 (24). 723–775.

165. Pallansch M.A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses,echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knippe D.M., Howley P.M., eds.*Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. – 2001. - 723-775.

166. Papa A. Genetic variation of Coxsackievirus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece / A. Papa, K. Dumaidi, F. Franzidou, A. Antoniadis // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2006. – Vol. 12 Numb. 7. – P. 688-691.

167. Paul JR, Trask JD, Gard S. Poliomyelitis virus in urban sewage. *J Exp Med* 1940;71:765-77.

168. Phan T.G. Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. / T.G. Phan, T. A. Nguyen, H. Shimizu, F. Yagyu, S. Okitsu, W. E. Müller, H. J. Ushijima // *Med. Virol.*, - 2005. - V. 77. № 2. - P. 257-264.

169. Rao C. D. Antigenic Diversity of Enteroviruses Associated with Nonpolio Acute Flaccid Paralysis, India, 2007–2009 / C. D. Rao, P. Yergolkar, K. S. Shankarappa // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. - Vol. 18. – P. 1833-1840.



170. Richter J. Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000–2002 / J. Richter, D. Koptides, C. Tryfonos, C. Christodoulou // *Journal of Medical Microbiology*. – 2006. - №55 – P. 1035–1041.

171. Roivainen M. Highly divergent neurovirulent vaccine-derived polioviruses of all three serotypes are recurrently detected in Finnish sewage // *Euro Surveill.* – 2010. - №15(19). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19566s>

172. Rotbart H.A. Viral meningitis / H.A. Rotbart // *Seminars in neurology*. - 2000. - 20(3). – P. 277-92.

173. Roth B. Epidemiologic Aspects and Laboratory Features of Enterovirus Infections in Western Germany, 2000–2005 / B. Roth, M. Enders, A. Arents, A. Pfitzner, E. Terletskaia-Ladwig // *Journal of Medical Virology*. - 2007. - №79. - P. 956–962.

174. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74. - 1977. - P. 5463 - 5467.

175. Savolainen C. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: Succession of dominant sublineages within a single major genotype / C. Savolainen, T. Hovi, M. N. // *Mulders Arch Virol.* – 2001. - № 146. - P. 521-537.

176. Senault R. Study of the effluents of septic tanks as a factor in the pollution of the external environment by fecal viruses. Results of a study in Meurthe and Moselle / R. Senault, J. M. Foliguet, R. Laurent, J.M. Martin // *Rev Hyg Med Soc.* – 1965. - Jun;13(4). - 283-302p.

177. Shafren D.R. Mouse cells expressing human intercellular adhesion molecule-1 are susceptible to infection by Coxsackievirus A21 / D.R. Shafren, D.J. Dorahy, S.J. Greive, G.F. Burns, R.D. Barry // *J. Virol.* – 1997. – Vol.71(1). – P. 785 - 789.

178. Silva P.A. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana / P. A. Silva, K. Stark, F. P. Mockenhaupt, K. Reither, T. Weitzel, R. Ignatius, E. Saad, A. Seidu-Korkor, U. Bienzle, E. Schreier // *J. Med. Virol.* - 2008. - V. 80. - P. 1790-1798.

179. Simmonds P. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses / P. Simmonds, J. Welch // *Journal of Virology.* – 2006. - Vol. 80, No. 1. - P.483–493.

180. Smura T. Molecular evolution and epidemiology of echovirus 6 in Finland / T. Smura, L. Kakkola, S. Blomqvist et al // *Infection, Genetics and Evolution* 16 (2013) 234–247

181. Stanway G. Family Picornaviridae / Stanway G., Brown F., Christian P. et al. // In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (eds.), *Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, London, United Kingdom. – 2005. - P. 757–778.

182. Tamura K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* - 2011. - Vol.28(10). - P 2731 - 2739.

183. Tao Z. Intercity Spread of Echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of Environmental Surveillance in Tracing Circulating Enteroviruses / Z. Tao, Y. Song, H. Wang, Y. Zhang, H. Yoshida, S. Ji, A. Xu, L. Song, Y. Liu, N.Cui, F. Ji, Y. Li, P. Chen, W. Xuc // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2012. - Volume 78 Number 19. – P. 6946–6953.

184. Thoelen I. Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000 / I. Thoelen, P. Lemey, Van Der Donck I., K. Beuselinck, A. M. Lindberg, Van Ranst M. // *J. Med. Virol.* – 2003. – Vol. 70, N3. – P. 420-429.

185. Trask J. D. The detection of poliomyelitis virus in flies collected during the epidemics of poliomyelitis / J. D. Trask, J. R. Paul // J. Exp Med. - 1943. - 77:531-544.
186. Wiley J. S. Pathogen Survival in Composting Municipal Wastes. / J. S. Wiley // J. Water Pollut. Control Fed. -1962. - 34:80.-P. 90.
187. World Health Assembly. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Geneva, Switzerland: WHA resolution no. WHA41.28, 1988.
188. Xiu-hui Yang Molecular Epidemiology of Echovirus 30 in Fujian China Between 2001 and 2011. / Xiu-hui Yang, Yan-sheng Yan, Yu-wei Weng, et al. // Journal of Medical Virology 85:696–702 (2013) ,
189. Zexin T. Cocirculation of Two Transmission Lineages of Echovirus 6 in Jinan, China, as Revealed by Environmental Surveillance and Sequence Analysis / Zexin Tao, Haiyan Wang, Yan Li, Aiqiang Xu, Yong Zhang, Lizhi Song, Hiromu Yoshida, Qing Xu, Jing Yang, Yan Zhang, Yao Liu, Lei Feng, Wenbo Xu // Appl Environ Microbiol. - 2011. - Jun 8;77(11). - P. 3786-92.
190. Zhang T. Epidemics and Frequent Recombination within Species in Outbreaks of Human Enterovirus B-Associated Hand, Foot and Mouth Disease in Shandong China in 2010 and 2011 / Ting Zhang., Jiang Du., Ying Xue., Haoxiang Su, Fan Yang, Qi Jin // Published.–2013. June19:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067157>

## Приложение 1

**Список регистрационных номеров нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VP1 штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, задепонированных в базе данных GenBank**

№ п/п	Наименование изолята, регистрационный номер в базе данных GenBank	Серотип	Год	Населенный пункт	Диагноз	Материал, откуда был выделен штамм
1	Entero_VP1_end.sqn 1019_CA9_10.2008 KP842494	CA9	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
2	Entero_VP1_end.sqn 1023_CA9_11.2011 KP842495	CA9	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
3	Entero_VP1_end.sqn 0591_CA9_07.2011 KP842496	CA9	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
4	Entero_VP1_end.sqn 0025_CA9_12.2011 KP842497	CA9	2011	Екатеринбург	менингит	ликвор
5	Entero_VP1_end.sqn 1005_CA9_09.2008 KP842498	CA9	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
6	Entero_VP1_end.sqn 1090_CA9_10.2008 KP842499	CA9	2008	Березовский	нет данных	фекалии
7	Entero_VP1_end.sqn 0786_CA9_08.2008 KP842500	CA9	2008	Первоуральск	нет данных	фекалии
8	Entero_VP1_end.sqn 0030_CA9_11.2011 KP842501	CA9	2011	Екатеринбург	менингит	ликвор
9	Entero_VP1_end.sqn 0003_CA9_07.2012 KP842502	CA9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
10	Entero_VP1_end.sqn 0568_CA9_07.2012 KP842503	CA9	2012	Серов	менингит	ликвор
11	Entero_VP1_end.sqn 0362_CA9_07.2013 KP842504	CA9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
12	Entero_VP1_end.sqn 3902_CA9_08.2013 KP842505	CA9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
13	Entero_VP1_end.sqn 1714_CA9_07.2012 KP842506	CA9	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии

14	Entero_VP1_end.sqn 0366_CA9_07.2012 KP842507	CA9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
15	Entero_VP1_end.sqn 0357_E30_07.2013 KP842508	E30	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
16	Entero_VP1_end.sqn 0356_E30_07.2013 KP842509	E30	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
17	Entero_VP1_end.sqn D100_E30_06.2007 KP842510	E30	2007	Первоуральск	нет данных	RD
18	Entero_VP1_end.sqn D160_E30_06.2007 KP842511	E30	2007	Первоуральск	нет данных	RD
19	Entero_VP1_end.sqn 0717_E30_10.2012 KP842512	E30	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
20	Entero_VP1_end.sqn 0556_E30_09.2014 KP842513	E30	2014	Курган	менингит	ликвор
21	Entero_VP1_end.sqn 0A15_E30_09.2008 KP842514	E30	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
22	Entero_VP1_end.sqn 1002_E30_09.2008 KP842515	E30	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
23	Entero_VP1_end.sqn 2009_E30_10.2008 KP842516	E30	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
24	Entero_VP1_end.sqn C758_E30_08.2008 KP842517	E30	2008	Первоуральск	нет данных	фекалии
25	Entero_VP1_end.sqn B003_E30_10.2008 KP842518	E30	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
26	Entero_VP1_end.sqn 0368_E6_07.2012 KP842519	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
27	Entero_VP1_end.sqn 0056_E6_08.2012 KP842520	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
28	Entero_VP1_end.sqn 1806_E6_08.2012 KP842521	E6	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
29	Entero_VP1_end.sqn 0498_E6_08.2012 KP842522	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
30	Entero_VP1_end.sqn 0580_E6_07.2011 KP842523	E6	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии

31	Entero_VP1_end.sqn 0044_E6_01.2012 KP842524	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
32	Entero_VP1_end.sqn 00A7_E6_10.2008 KP842525	E6	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
33	Entero_VP1_end.sqn 0F16_E6_10.2005 KP842526	E6	2005	Екатеринбург	менингит	ликвор
34	Entero_VP1_end.sqn 0645_E11_01.2012 KP842527	E11	2012	Екатеринбург	нет данных	фекалии
35	Entero_VP1_end.sqn 0A10_E11_10.2008 KP842528	E11	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
36	Entero_VP1_end.sqn 0A21_E11_09.2008 KP842529	E11	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
37	Entero_VP1_end.sqn 1168_E11_10.2008 KP842530	E11	2008	Алапаевск	нет данных	фекалии
38	Entero_VP1_end.sqn 0B12_E11_09.2008 KP842531	E11	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
39	Entero_VP1_end.sqn 00A1_E17_09.2008 KP842532	E17	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
40	Entero_VP1_end.sqn 0A12_E17_09.2008 KP842533	E17	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
41	Entero_VP1_end.sqn 1024_E17_09.2008 KP842534	E17	2008	Екатеринбург	нет данных	фекалии
42	Entero_VP1_end.sqn 1031_E17_09.2008 KP842535	E17	2008	Екатеринбург	нет данных	фекалии
43	Entero_VP1_end.sqn 2240_E25_01.2013 KP842536	E25	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
44	Entero_VP1_end.sqn 2044_E25_11.2012 KP842537	E25	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
45	Entero_VP1_end.sqn 00B4_E7_09.2008 KP842538	E7	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
46	Entero_VP1_end.sqn C669_E7_07.2008 KP842539	E7	2008	Ирбит	нет данных	фекалии
47	Entero_VP1_end.sqn 0462_E7_08.2012 KP842540	E7	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор

48	Entero_VP1_end.sqn 00B5_E7_10.2008 KP842541	E7	2008	Екатеринбург	менингит	ликвор
49	Entero_VP1_end.sqn 0353_E9_01.2013 KP842542	E9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
50	Entero_VP1_end.sqn 0718_E5_10.2012 KP842543	E5	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
51	Entero_VP1_end.sqn 0F30_E5_07.2005 KP842544	E5	2005	Екатеринбург	менингит	ликвор
52	Entero_VP1_end.sqn 0F25_E5_07.2005 KP842545	E5	2005	Екатеринбург	нет данных	фекалии
53	Entero_VP1_end.sqn C910_E5_08.2008 KP842546	E5	2008	Первоуральск	менингит	ликвор
54	Entero_VP1_end.sqn 1798_CB5_08.2012 KP842547	CB5	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
55	Entero_VP1_end.sqn 0838_CB5_09.2013 KP842548	CB5	2013	Ирбит	ЭВИ	RD/фекалии
56	Entero_VP1_end.sqn C760_CB5_08.2008 KP842549	CB5	2008	Первоуральск	нет данных	фекалии
57	Entero_VP1_end.sqn 0372_CB3_07.2013 KP842550	CB3	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
58	Entero_VP1_end.sqn 1611_CB3_06.2012 KP842551	CB3	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
59	Entero_VP1_end.sqn 1639_CB3_06.2012 KP842552	CB3	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
60	Entero_VP1_end.sqn 0149_CB1_07.2010 KP842553	CB1	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
61	Entero_VP1_end.sqn 0483_CB1_08.2012 KP842554	CB1	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
62	Entero_VP1_end.sqn 0722_CB1_10.2012 KP842555	CB1	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
63	Entero_VP1_end.sqn 1068_CB2_10.2013 KP842556	CB2	2013	Реж	ЭВИ	RD\фекалии
64	Entero_VP1_end.sqn 0131_CB4_07.2010 KP842557	CB4	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии

65	Entero_VP1_end.sqn 0612_CB4_09.2014 KP842558	CB4	2014	Краснотурьинск	менингит	ликвор
66	Entero_VP1_end.sqn 0502_CB4_09.2014 KP842559	CB4	2014	Первоуральск	ЭВИ	фекалии



## Приложение 2

**Список регистрационных номеров нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VP2 штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, задепонированных в базе данных GenBank**

№ П/П	Наименование изолята, регистрационный номер в базе данных GenBank	Серотип	Год	Населенный пункт	Диагноз	Материал, откуда был выделен штамм
1	EV_VP2_All_End 0073_CA1_07.2010 KP747477	CA1	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
2	EV_VP2_All_End 0560_CA2_07.2011 KP747478	CA2	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
3	EV_VP2_All_End 0279_CA2_09.2010 KP747479	CA2	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
4	EV_VP2_All_End 0619_CA2_07.2011 KP747480	CA2	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
5	EV_VP2_All_End 2745_CA2_06.2013 KP747481	CA2	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
6	EV_VP2_All_End 2679_CA4_06.2013 KP747482	CA4	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
7	EV_VP2_All_End 3335_CA4_06.2014 KP747483	CA4	2014	Екатеринбург	здоровый	фекалии
8	EV_VP2_All_End 0493_CA5_06.2011 KP747484	CA5	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
9	EV_VP2_All_End 0032_CA5_06.2010 KP747485	CA5	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
10	EV_VP2_All_End 2874_CA5_08.2013 KP747486	CA5	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
11	EV_VP2_All_End 2813_CA5_08.2013 KP747487	CA5	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
12	EV_VP2_All_End 2028_CA9_11.2012 KP747488	CA9	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
13	EV_VP2_All_End 2818_CA9_08.2013 KP747489	CA9	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии

14	EV_VP2_All_End 0003_CA9_07.2012 KP747490	CA9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
15	EV_VP2_All_End 0030_CA9_11.2011 KP747491	CA9	2011	Екатеринбург	менингит	ликвор
16	EV_VP2_All_End 0025_CA9_12.2011 KP747492	CA9	2011	Екатеринбург	менингит	ликвор
17	EV_VP2_All_End 0591_CA9_07.2011 KP747493	CA9	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
18	EV_VP2_All_End 0568_CA9_07.2012 KP747494	CA9	2012	Серов	менингит	ликвор
19	EV_VP2_All_End 3902_CA9_08.2013 KP747495	CA9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
20	EV_VP2_All_End 0362_CA9_07.2013 KP747496	CA9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
21	EV_VP2_All_End 0366_CA9_07.2012 KP747497	CA9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
22	EV_VP2_All_End 0412_CA9_10.2013 KP747498	CA9	2013	Алапаевск	менингит	ликвор
23	EV_VP2_All_End 0067_CA9_2012 KP747499	CA9	2012	Челябинск	менингит	ликвор
24	EV_VP2_All_End 0506_CA9_08.2012 KP747500	CA9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
25	EV_VP2_All_End 0405_CA10_07.2013 KP747501	CA10	2013	п.Сарапулка	герпангин а	Носоглоточ ный смыв
26	EV_VP2_All_End 0120_CA10_07.2013 KP747502	CA10	2013	Курган	ЭВИ	Культура клеток
27	EV_VP2_All_End 0845_CA22_09.2011 KP747503	CA22	2011	Екатеринбург	здоровый	фекалии
28	EV_VP2_All_End 1813_CA22_08.2012 KP747504	CA22	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
29	EV_VP2_All_End 2887_CA22_08.2013 KP747505	CA22	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
30	EV_VP2_All_End 0292_CB5_06.2014 KP747506	CB5	2014	Екатеринбург	менингит	ликвор

31	EV_VP2_All_End 5887_CB5_11.2013 KP747507	CB5	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
32	EV_VP2_All_End 0838_CB5_09.2013 KP747508	CB5	2013	Ирбит	ЭВИ	RD(фекалии )
33	EV_VP2_All_End 0253_CB5_10.2013 KP747509	CB5	2013	Каиенск- Уральский	ЭВИ	Нер (фекалии)
34	EV_VP2_All_End 1798_CB5_08.2012 KP747510	CB5	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
35	EV_VP2_All_End 0581_CB1_08.2012 KP747511	CB1	2012	Первоуральск	ЭВИ	RD
36	EV_VP2_All_End 0469_CB1_08.2012 KP747512	CB1	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
37	EV_VP2_All_End 0149_CB1_07.2010 KP747513	CB1	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
38	EV_VP2_All_End 0722_CB1_10.2012 KP747514	CB1	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
39	EV_VP2_All_End 0483_CB1_08.2012 KP747515	CB1	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
40	EV_VP2_All_End 5391_CB2_10.2013 KP747516	CB2	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
41	EV_VP2_All_End 2809_CB2_08.2013 KP747517	CB2	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
42	EV_VP2_All_End 1278_CB2_11.2013 KP747518	CB2	2013	Нижний Тагил	ЭВИ	RD (фекалии)
43	EV_VP2_All_End 1068_CB2_10.2013 KP747519	CB2	2013	Реж	ЭВИ	RD (фекалии)
44	EV_VP2_All_End 0552_CB2_07.2013 KP747520	CB2	2013	Курган	менингит	ликвор
45	EV_VP2_All_End 3023_CB4_11.2013 KP747521	CB4	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
46	EV_VP2_All_End 0131_CB4_07.2010 KP747522	CB4	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
47	EV_VP2_All_End 2697_CB4_06.2013 KP747523	CB4	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии

48	EV_VP2_All_End 2846_CB4_08.2013 KP747524	CB4	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
49	EV_VP2_All_End 0409_CB4_07.2013 KP747525	CB4	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
50	EV_VP2_All_End 0612_CB4_09.2014 KP747526	CB4	2014	Красноурьинск	менингит	ликвор
51	EV_VP2_All_End 0611_CB4_10.2013 KP747527	CB4	2013	Нижний Тагил	ЭВИ	фекалии
52	EV_VP2_All_End 730_CB4_10.2013 KP747528	CB4	2013	Екатеринбург	ЭВИ	RD (фекалии)
53	EV_VP2_All_End 0622_CB4_09.2012 KP747529	CB4	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
54	EV_VP2_All_End 0502_CB4_2014 KP747530	CB4	2014	Первоуральск	ЭВИ	фекалии
55	EV_VP2_All_End 0298_E18_06.2013 KP747531	E18	2013	Первоуральск	менингит	ликвор
56	EV_VP2_All_End 0479_E18_08.2012 KP747532	E18	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
57	EV_VP2_All_End 0602_E18_09.2012 KP747533	E18	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
58	EV_VP2_All_End 1991_E18_10.2012 KP747534	E18	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
59	EV_VP2_All_End 0396_E18_07.2013 KP747535	E18	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
60	EV_VP2_All_End 0256_E18_05.2014 KP747536	E18	2014	Екатеринбург	менингит	ликвор
61	EV_VP2_All_End 09A5_E30_06.2009 KP747537	E30	2009	Екатеринбург	менингит	ликвор
62	EV_VP2_All_End D634_E30_09.2007 KP747538	E30	2007	Екатеринбург	менингит	ликвор
63	EV_VP2_All_End 0556_E30_09.2014 KP747539	E30	2014	Красноурьинск	ЭВИ	фекалии
64	EV_VP2_All_End 1042_E30_09.2013 KP747540	E30	2013	Красноурьинск	менингит	RD (фекалии)

65	EV_VP2_All_End 2897_E30_09.2013 KP747541	E30	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
66	EV_VP2_All_End 1556_E30_07.2013 KP747542	E30	2013	Курган	менингит	ликвор
67	EV_VP2_All_End 0017_E30_07.2013 KP747543	E30	2013	Тюмень	менингит	ликвор
68	EV_VP2_All_End 0270_E30_08.2009 KP747544	E30	2009	Екатеринбург	менингит	ликвор
69	EV_VP2_All_End 0010_E7_07.2012 KP747545	E7	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
70	EV_VP2_All_End 0068_E7_2012 KP747546	E7	2012	Челябинск	менингит	ликвор
71	EV_VP2_All_End 0749_E7_09.2012 KP747547	E7	2012	УФА	ЭВИ	RD
72	EV_VP2_All_End 0078_E7_2012 KP747548	E7	2012	Челябинск	менингит	ликвор
73	EV_VP2_All_End 0051_E7_07.2012 KP747549	E7	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
74	EV_VP2_All_End 0016_E9_10.2012 KP747550	E9	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
75	EV_VP2_All_End 0351_E9_07.2013 KP747551	E9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
76	EV_VP2_All_End 0458_E9_07.2013 KP747552	E9	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
77	EV_VP2_All_End 0645_E11_01.2012 KP747553	E11	2012	Екатеринбург	нет данных	фекалии
78	EV_VP2_All_End 2657_E11_06.2013 KP747554	E11	2013	Екатеринбург	здоровый	фекалии
79	EV_VP2_All_End 1976_E25_10.2012 KP747555	E25	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
80	EV_VP2_All_End 2210_E25_12.2012 KP747556	E25	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
81	EV_VP2_All_End 0707_E25_10.2012 KP747557	E25	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
82	EV_VP2_All_End 0157_E25_08.2010	E25	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии

	KP747558					
83	EV_VP2_All_End 0088_E14_07.2010 KP747559	E14	2010	Екатеринбург	здоровый	фекалии
84	EV_VP2_All_End 0182_E14_04.2014 KP747560	E14	2014	Екатеринбург	менингит	ликвор
85	EV_VP2_All_End 0398_E14_07.2012 KP747561	E14	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
86	EV_VP2_All_End 0476_CB3_08.2012 KP747562	CB3	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
87	EV_VP2_All_End 5052_E6_09.2013 KP747563	E6	2013	Екатеринбург	менингит	ликвор
88	EV_VP2_All_End 1806_E6_08.2012 KP747564	E6	2012	Екатеринбург	здоровый	фекалии
89	EV_VP2_All_End 0608_E6_09.2014 KP747565	E6	2014	Верхотурье	менингит	ликвор
90	EV_VP2_All_End 0539_E6_07.2012 KP747566	E6	2012	Алапаевск	ЭВИ	фекалии
91	EV_VP2_All_End 0498_E6_08.2012 KP747567	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
92	EV_VP2_All_End 0434_E6_10.2013 KP747568	E6	2013	Полевской	менингит	ликвор
93	EV_VP2_All_End 0080_E6_2012 KP747569	E6	2012	Челябинск	менингит	ликвор
94	EV_VP2_All_End 0044_E6_01.2012 KP747570	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
95	EV_VP2_All_End 0056_E6_08.2012 KP747571	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор
96	EV_VP2_All_End 0368_E6_07.2012 KP747572	E6	2012	Екатеринбург	менингит	ликвор