

Л.Н. Голицына, В.В. Зверев, Н.А. Новикова, С.Г. Фомина, О.В. Парфенова, Н.В. Епифанова, Л.Б. Луковникова,
О.В. Морозова, Н.В. Пономарева

Обнаружение, особенности циркуляции и разнообразие парэховирусов человека в Нижнем Новгороде

ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора

Проведено исследование 5230 проб копроматериала от детей в возрасте до 17 лет с диагнозом острой кишечной инфекции (ОКИ), госпитализированных в Нижнем Новгороде в 2006–2010 гг. Парэховирусы человека (ПЭВ) выявляли на протяжении всего периода исследований, в среднем с частотой 6,16%, преимущественно (65,83%) в группе детей до 3 лет. Тип вируса методом секвенирования VP3-VP1 области генома идентифицирован в 71 случае: ПЭВ1 (91,55%), ПЭВ6 (5,63%), ПЭВ3 (3,08%) и ПЭВ4 (1,54%). Большинство ПЭВ1 принадлежали к генотипу В, ПЭВ1 генотипа А идентифицированы в единичных случаях. Шесть штаммов ПЭВ1, последовательности которых образовали самостоятельную филогенетическую группу и имели не более 88% гомологии с известными последовательностями ПЭВ генотипов 1А и 1В, могут быть охарактеризованы как представители отдельного генотипа ПЭВ1.

Ключевые слова: парэховирусы человека, обнаружение, генотипы парэховирусов человека

Prevalence, Features of Circulation, and Diversity of Human Parechoviruses in Nizhny Novgorod

L. N. Golitsyna, V. V. Zverev, N. A. Novikova, S. G. Fomina, O. V. Parfenova, N. V. Epifanova,
L. B. Lukovnikova, O. V. Morozova, N. V. Ponomareva

Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Nizhny Novgorod, Russia

A total of 5230 specimens from children with gastroenteritis collected in Nizhny Novgorod in 2006-2010 were screened for human parechoviruses (HPeV). HPeV were observed every year with mean frequency of 6.16%. The majority of HPeV (65.83%) was detected in children younger than 3 years. The typing of 71 detected HPeV with the use of partial sequencing of the VP3-VP1 region revealed the presence of HPeV1 (91.55%), HPeV6 (5.63%), HPeV3 (3.08%), HPeV4 (1.54%). HPeV1B was predominant among HPeV1, HPeV1A was identified rarely. Six stains of HPeV1 formed separate phylogenetic cluster, had sequence homology with HPeV1A or HPeV1B not more than 88% and could be characterized as members of a separate genotype HPeV1.

Key words: human parechoviruses, prevalence, genotype of human parechoviruses

Парэховирусы (ПЭВ) человека – мелкие безоболочечные вирусы с РНК-геномом позитивной полярности, вместе с вирусами *Ljungan* относятся к роду *Parechovirus* обширного семейства *Picornaviridae*. Охарактеризованные первоначально (на основании сходства ряда биологических и патологических свойств) как энтеровирусы человека, вирусы ЕСНО22 и ЕСНО23 в конце 90-х годов прошлого века были выделены в самостоятельный род и реклассифицированы как ПЭВ человека 1-го и 2-го типов соответственно [17]. Вскоре был открыт ПЭВ человека 3-го типа [11]. В настоящее время охарактеризованы 16 типов ПЭВ человека [www.picornaviridae.com]. У парэховирусов 1-го типа (ПЭВ1) различают 2 генотипа 1А и 1В [5]. ПЭВ распространены во всем мире и играют определенную роль в инфекционной патологии человека. Подобно энтеровирусам, они могут вызывать различные по клиническим проявлениям заболевания: респираторные, гастроэнтерит, лихорадку, острый вялый паралич, серозный менингит, миокардит, экзантему, неонатальный сепсис и др. При этом отмечено, что ПЭВ-инфекция наблюдается преимущественно у детей первых лет жизни и чаще всего протекает бессимптомно или проявляется в виде респираторных и диарейных заболеваний [2–4, 10,

12, 16, 17]. Циркуляция ПЭВ в России впервые была отмечена нами [1].

Цель исследования – характеристика особенностей циркуляции ПЭВ человека среди населения Нижнего Новгорода, изучение их разнообразия.

Материалы и методы

В работе исследовали пробы копроматериала от 5230 детей в возрасте до 17 лет, госпитализированных с диагнозом острой кишечной инфекции (ОКИ) в инфекционный стационар Нижнего Новгорода в 2006-2010 гг.; 10 образцов фекалий (от 10 детей и 3 контактных взрослых) с положительным результатом исследования на ПЭВ, собранных при расследовании вспышки ОКИ в дошкольном образовательном учреждении Нижнего Новгорода в 2006 г.

ПЭВ выявляли методом ОТ-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении 5'-НТР генома ПЭВ, предложенных М. Oberste и соавт. в 1999 г. [14]. Параллельно эти же пробы тестировали на наличие других кишечных вирусов (рога-, калици-, адено-, астро-, энтеровирусов, вируса гепатита А с помощью тест-систем производства Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва) торо-, бокавирусов,

Контактная информация:

Голицына Людмила Николаевна, канд. биол. наук, вед. нуч. сотр.; e-mail: mevircf@rambler.ru



Рис. 1. Доля ПЭВ-инфекции в структуре вирусных ОКИ в Нижнем Новгороде в 2006–2010 гг.

вируса Аичи с использованием лабораторных тест-систем).

Тип ПЭВ определяли методом секвенирования области VP3-VP1 генома [10]. Определение первичной структуры кДНК осуществляли с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1. в автоматическом режиме. Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК использовали для идентификации близкородственных штаммов ПЭВ человека в программе BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].

Для филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности ПЭВ, представленные в базе данных GenBank под номерами AB084913, AB112485, AB252582, AJ889918, DQ315670, EF051629, EU077518, FJ373204, FJ763393, GQ183035, GU125393, GU946777, HQ171852, HQ384385, L02971. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения MEGA 5.02 [18]. Филогенетические деревья были построены по алгоритму maximum composite likelihood с помощью модели Tamura-Nei, проанализировано по 100 бутстреп-псевдорепликатов. Группы последовательностей с бутстреп-поддержкой менее 70% при анализе не учитывали.

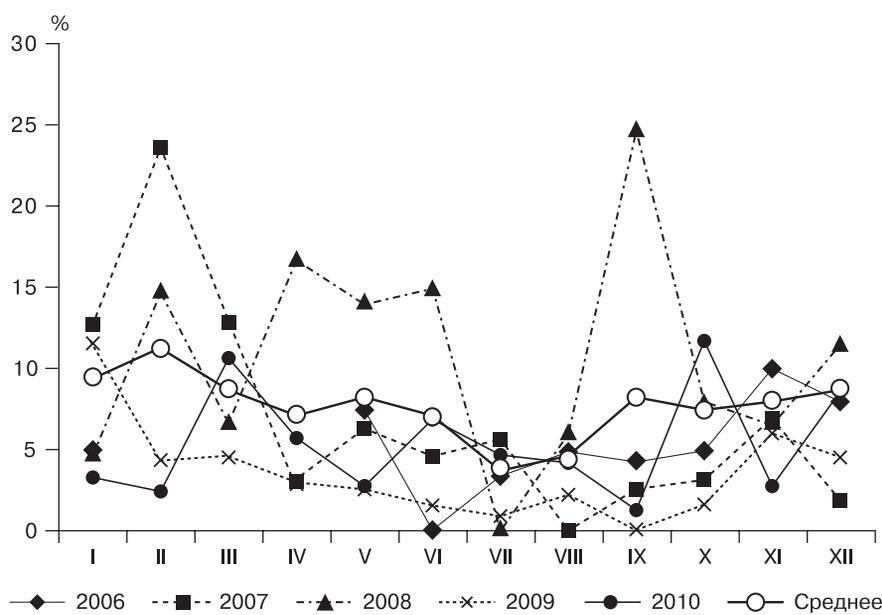


Рис. 2. Помесячная частота обнаружения ПЭВ в Нижнем Новгороде в 2006–2010 гг.

Установленные нуклеотидные последовательности фрагментов области VP3-VP1 генома ПЭВ доступны в базе данных GenBank под номерами JF330795 – JF330833, JQ437842 – JQ437871.

Результаты и обсуждение

При исследовании 5230 фекальных проб от детей с ОКИ методом ОТ-ПЦР ПЭВ были выявлены в 6,16% (322 образца) случаев. При этом доля пациентов с ПЭВ-инфекцией среди больных с установленной вирусной этиологией заболевания составила 10,18% (рис. 1). В 63,95% проб, содержащих ПЭВ, одновременно были обнаружены другие кишечные вирусы. Наиболее часто (55,22% ассоциаций ПЭВ + другие вирусы) ПЭВ обнаруживали совместно с ротавирусами, реже с калици- и энтеровирусами (28,85 и 22,39% соответственно), в единичных случаях – с адено-, астро-, бокавирусами, вирусом Аичи, вирусом гепатита А.

Частота обнаружения ПЭВ у больных ОКИ в разные годы варьировала: максимум (11,7%) был отмечен в 2008 г., минимум (3,35%) – в 2009 г. В 2006, 2007, 2010 гг. этот показатель составил 5,11, 7,3 и 6% соответственно.

В большинстве случаев ПЭВ (82,13%) были обнаружены у детей дошкольного возраста, при этом 65,83% от общего числа обследованных составили дети до 3 лет включительно. Однако частота обнаружения ПЭВ у детей, больных ОКИ, в разных возрастных группах достоверно не различалась.

По средним 5-летним данным, ПЭВ у больных ОКИ обнаруживали в Нижнем Новгороде в течение всего года (рис. 2). Пики частоты обнаружения ПЭВ были отмечены в феврале 2007 г. и сентябре 2008 г.: 23,61 и 24,71% соответственно. Самое низкое значение этого показателя зарегистрировано в июле–августе: в среднем за 5 лет в эти месяцы он составил соответственно 3,70 и 4,37%.

Тип ПЭВ был установлен в 71 из 82 случайно выбранных положительных проб. ПЭВ1 идентифицировали чаще других типов – в 65 пробах, что составило 91,55% всех типированных вирусов. ПЭВ6 был обнаружен в 4 (5,63%) пробах, при этом в одной из этих

проб одновременно присутствовал ПЭВ1. ПЭВ3 был выявлен в 2 (3,08%) пробах, ПЭВ4 – в 1 (1,54%) пробе. На рис. 3 проиллюстрировано генетическое разнообразие идентифицированных ПЭВ. ПЭВ1 были филогенетически неоднородны и распределены по трем филогенетическим группам. Подавляющее большинство штаммов группировалось с вирусами генотипа 1В, 3 штамма – с вирусами генотипа 1А. Последовательности 6 штаммов ПЭВ1 (на рисунке представлены последовательности 3 штаммов) образовали самостоятельную филогенетическую группу, их гомология с последовательностью прототипного штамма ПЭВ1 Harris была не менее 79,3% и в то же время не превышала 88% с представленными в GenBank последовательностями ПЭВ генотипов 1А и 1В.

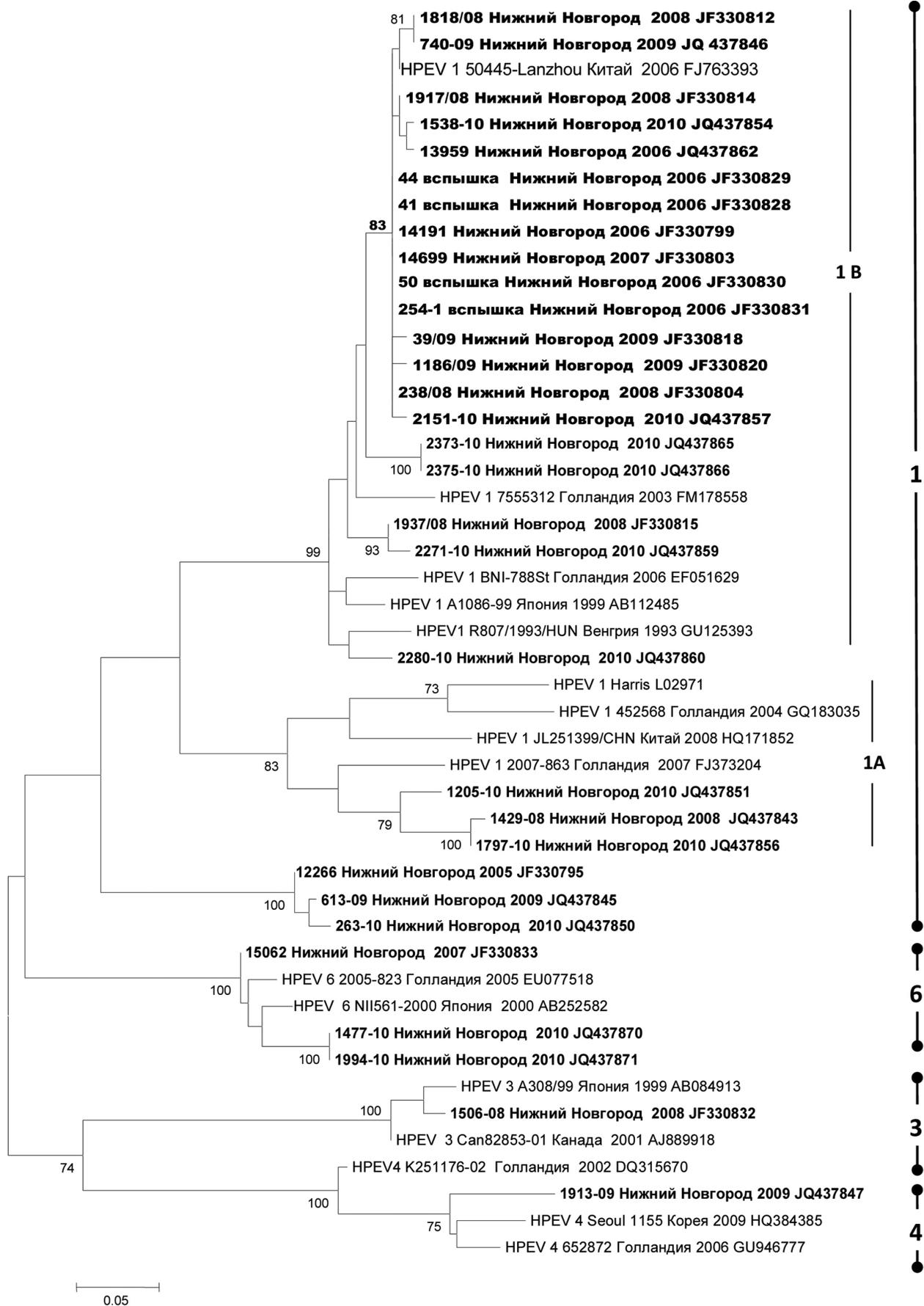


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидной последовательности области VP3-VP1 генома референс-штаммов и штаммов ПЭВ человека, идентифицированных в Нижнем Новгороде. Цифры в узлах дерева – процент бутстреп-псевдореplikатов, в которых наблюдали данную группу.

В марте 2006 г. в одном из детских комбинатов Нижнего Новгорода была зарегистрирована вспышка ОКИ у детей 3–4 лет. Заболевание проявлялось тошнотой, рвотой, диареей, высокой температурой. Бактериологический анализ дал отрицательный результат. При проведении лабораторных исследований на наличие кишечных вирусов ротавирусы были обнаружены в одном случае, энтеровирусы – в двух, ПЭВ были идентифицированы у 10 (41,5%) детей и 3 взрослых – работников комбината. Тип ПЭВ удалось установить в 4 случаях: все выявленные вирусы принадлежали одной и той же филогенетической группе ПЭВ 1-го типа.

ПЭВ человека широко распространены во всем мире. Ежегодная циркуляция ПЭВ (преимущественно ПЭВ1 и ПЭВ3) зарегистрирована в результате многолетних наблюдений в США, Голландии и Японии [6, 12, 13, 16]. При проведении нашего мониторинга ПЭВ также выявлялись постоянно, за исключением 4 мес, при этом частота обнаружения ПЭВ варьировала в разные годы от 3,35 до 11,7%. В других странах в разные годы отмечалась разная частота обнаружения ПЭВ. В г. Айчи (Япония) в 1998–2008 гг. средняя частота обнаружения ПЭВ в пробах стула детей с предполагаемой вирусной инфекцией составляла 2,2% [12], в Голландии в 2004–2006 гг. подобный показатель при обследовании детей с подозрением на энтеровирусную инфекцию достигал 16,3% [4]. В Германии в 2004 г. у детей с энтеритом в возрасте до 2 лет ПЭВ были обнаружены в 11,6% случаев [13]. В Шри Ланке в 2005–2006 гг. и Южной Корее в 2008–2010 гг. частота обнаружения ПЭВ у детей с гастроэнтеритом составила 8,3 и 2% соответственно [9, 15]. В Китае в 2006–2007 гг. у детей с гастроэнтеритом ПЭВ были выявлены в 29,4% случаев, при этом у здоровых детей частота обнаружения ПЭВ также была высока – 15,3% [19].

По данным зарубежных исследователей, отмечено, что ПЭВ-инфекция в подавляющем большинстве случаев регистрируется у детей в возрасте до 5 лет [3, 4, 8, 10, 16]. В наших исследованиях большинство ПЭВ также было обнаружено у детей дошкольного возраста.

Отсутствие выраженной сезонности ПЭВ-инфекции, установленное в результате наших наблюдений, отмечается в последнее десятилетие и другими авторами [4]. В некоторых работах показано, что для ПЭВ разного типа может быть характерна различная сезонность [16, 19]. Примечательно, что полученная нами (на фоне доминирования ПЭВ1) среднемноголетняя кривая помесечной частоты обнаружения ПЭВ иллюстрирует сезонность, аналогичную сезонности ПЭВ1, установленную в результате 8-летнего наблюдения (2000–2007) в Голландии [16].

ПЭВ человека характеризуются типовым разнообразием, на разных территориях отмечается одновременная циркуляция ПЭВ разных типов [3, 4, 10, 16]. Наибольшее число случаев ПЭВ-инфекции, зарегистрированной в мире, было связано с ПЭВ1, при этом в последнее десятилетие доминирует ПЭВ генотипа 1В [5, 7]. На втором месте по частоте обнаружения находится ПЭВ3. В число широко распространенных в настоящее время ПЭВ входят также ПЭВ 4–6 типов [4, 6, 12, 13, 16]. ПЭВ1 превалировал среди ПЭВ, идентифицированных у больных острыми кишечными и респираторными заболеваниями, а ПЭВ3

чаще выявляли при неврологических заболеваниях и неонатальном сепсисе [16]. При этом можно отметить, что при обследовании больных с гастроэнтеритом обнаруживали самый широкий спектр ПЭВ. Следовательно, обследование данного контингента детей может быть оптимальным при изучении разнообразия ПЭВ, циркулирующих на той или иной территории. В результате нашего наблюдения в Нижнем Новгороде в 2006–2010 гг. была установлена циркуляция ПЭВ 4 типов. Так же как и во всем мире, доминировал ПЭВ генотипа 1В. Реже выявлялся ПЭВ генотипа 1А, который включает вирусы, родственные "старому" прототипному штамму. Циркуляция ПЭВ генотипа 1А отмечена в Европе и странах Юго-Восточной Азии [5, 7]. Нуклеотидные последовательности шести нижегородских ПЭВ1, выявленных на протяжении всего периода исследований, имели низкую гомологию с последовательностями вирусов известных генотипов ПЭВ 1-го типа. При дальнейшем изучении эта группа вирусов может быть охарактеризована как новый генотип ПЭВ1.

В свою очередь идентифицированные нами ПЭВ генотипа 1В были филогенетически неоднородны. На рис. 3 видно, что большая часть последовательностей этих вирусов образовала наиболее представительную группу с высокой бутстреп-поддержкой. Вирусы, принадлежащие к этой группе, выявлялись ежегодно. К этой же группе принадлежали все ПЭВ1, идентифицированные при расшифровке вспышки ОКИ в детском образовательном учреждении в Нижнем Новгороде в 2006 г. Высокая гомология нуклеотидных последовательностей (99–100%) нижегородских ПЭВ и вирусов, идентифицированных у детей с гастроэнтеритом в Китае в 2006–2007 гг., свидетельствует об их близком родстве и едином происхождении. Гомология последовательностей вирусов этой группы с последовательностями европейских штаммов ПЭВ генотипа 1В была более низкой и не превышала 95%.

В данной работе представлены результаты первого исследования, посвященного изучению особенностей циркуляции ПЭВ в России (на примере Нижнего Новгорода). В течение 5 лет регистрировали ежегодную циркуляцию ПЭВ человека в этом городе. Продемонстрировано отсутствие выраженной сезонности ПЭВ-инфекции. Выявлены ПЭВ человека 1, 3, 4 и 6-го типов. Показана генетическая гетерогенность нижегородской популяции ПЭВ человека 1-го типа, установлено доминирование ПЭВ генотипа 1В, который широко циркулирует и доминирует в мире в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Новикова Н.А. и др. Обнаружение парэховирусов у детей с гастроэнтеритом. В кн.: Материалы IX съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 26–27 апреля 2007 г., Москва. М.: Санэпидемия; 2007: 224–5.
2. Abed Y., Boivin G. Human parechovirus infection in Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12 (6): 969–75.
3. Baumgarte S., de Souza Luna L.K., Grywna K. et al. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a six parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (1): 242–8.
4. Benschop K., Thomas X., Serpenti C. et al. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (12): 3965–70.
5. Calvert J., Chieochansin T., Benschop K.S. et al. Recombination dynamics of human parechoviruses: investigation of type-specific dif-

- ferences in frequency and epidemiological correlates. *J. Gen. Virol.* 2010; 91: 1299–38.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance — United States, 2006–2008. *MMWR.* 2010; 59: 1577–80.
 7. Chieochansin T, Vichiwattana P, Korkong S. et al. Molecular epidemiology, genome characterization, and recombination event of human parechovirus. *Virology.* 2011; 421: 159–66.
 8. Ehrnst A, Eriksson M. Epidemiological features of type 22 echovirus infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993; 25: 275–81.
 9. Han T.H., Kim C.H., Park S.H. et al. Detection of human parechoviruses in children with gastroenteritis in South Korea. *Arch. Virol.* 2011; 156: 1471–5.
 10. Harvala H., Robertson I., McWilliam Leitch E.C. et al. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (10): 3446–53.
 11. Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H. et al. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J. Gen. Virol.* 2004; 85: 391–8.
 12. Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H. et al. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48 (8): 2683–8.
 13. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberst S., Pallansch M.A. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR.* 2006; 55: 1–20.
 14. Oberste M.S., Maher K., Pallansch M.A. Specific detection of echoviruses 22 and 23 in cell culture supernatants by RT-PCR. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 178–81.
 15. Pham N.T.H., Takanashi S., Tran D.N. et al. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 364–6.
 16. Sanden S., Bruin E., Vennema H. et al. Prevalence of Human parechovirus in Netherlands in 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (9): 2884–9.
 17. Stanway G., Hyypia T. Parechoviruses. *J. Virol.* 1999; 73: 5249–54.
 18. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731–9.
 19. Zhang D.L., Jin Y., Li D.D., Cheng W.X. et al. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 11: 1156–9.

Поступила 18.04.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.831-002-022:578.833.261-036.111-036.88

**В.В. Погодина¹, Л.С. Левина¹, С.М. Скрынник², Н.С. Травина³, Л.С. Карань⁴, Н.М. Колясникова¹,
В.Я. Кармышева¹, С.Г. Герасимов¹, Г.В. Маленко¹, Л.В. Перминов³, М.А. Попов⁵, Н.Г. Бочкова¹**

Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента

¹ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва; ²Департамент здравоохранения Курганской области; ³ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Курганской области, ⁴ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; ⁵ГКУ Курганское областное патолого-анатомическое бюро

В популяции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в Курганской области доминирует сибирский подтип (100%). Население вакцинируется отечественными вакцинами, приготовленными из штаммов дальневосточного подтипа. Среди 601 обследованного больного 143 (23,79%) были привиты по полной или незавершенной схеме. Из них 76,9% были привиты вакциной "Энцевир" НПО "Микроген", Томск. В 2010 г. зарегистрирован случай КЭ у 6-кратно вакцинированной больной 49 лет. Заболевание развилось через 2 года после последней ревакцинации и через 5 дней после укуса клеща. Длительность болезни от появления первых симптомов до летального исхода – 55 ч. В стационаре после введения иммуноглобулина у больной появились генерализованные судороги, отек мозга, нарушение дыхания. Из ткани спинного мозга выделен высоковирулентный штамм ВКЭ сибирского подтипа. Обсуждаются возможные механизмы развития заболевания, включая гетеротипичность вакцинных штаммов и феномен антителозависимого усиления инфекции.

Ключевые слова: летальный клещевой энцефалит, сибирский подтип вируса, вакцинация

Tick-borne Encephalitis with Fulminant Course and Lethal Outcome in Patients after Plural Vaccination

**V. V. Pogodina¹, L. S. Levina¹, S. M. Skrynnik², N. S. Travina³, L. S. Karan⁴, N. M. Kolyasnikova¹,
V. Ya. Karmysheva¹, S. G. Gerasimov¹, G. V. Malenko¹, L. V. Perminov³, M. A. Popov⁵, N. G. Bochkova¹**

¹ Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia;

² Department of Public Health, Kurgan Region, Russia; ³ Centre of Hygiene and Epidemiology, Kurgan Region, Russia;

⁴ Central Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Moscow, Russia; ⁵ Kurgan Regional Pathologoanatomical Centre, Kurgan, Russia

In the Kurgan region, the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) is dominant. The vaccines prepared from Far-Eastern TBEV subtype are used in this area. Among TBE patients in 2007–2011, 23.79% were vaccinated according to complete or incomplete course. 76.9% of persons were vaccinated with Encevir vaccine, Tomsk. An unusual focal form of TBE with fulminant disease with lethal outcome was developed in a patient who was vaccinated 6 times with heterotype vaccines produced using the strains of the Far-Eastern TBE subtype. Inoculation of immunoglobulin in hospital produced aggravation of clinical symptoms, development of convulsions, brain oedema, and respiratory distress syndrome. The disease continues only 55 hours from first symptoms to fatal outcome. Siberian subtype of TBEV was isolated from patient spinal cord (Kurgan-118-2010 strain). Possible mechanisms of this disease are discussed.

Key words: Fatal TBE case, Siberian subtype, plural vaccination