

Лободанов С.А.^{1,2}, Киселев И.С.¹, Аммур Ю.И.¹, Горбаленя А.Е.^{3,4}, Claas E. C. J.³, Зверев В.В.¹, Файзулов Е.Б.¹

Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г.

¹ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; ²ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; ³Отдел медицинской микробиологии, Медицинский центр Лейденского университета, г. Лейден, 2314ЕВ, Нидерланды; ⁴Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, г. Москва

Риновирусы (РВ) и коронавирусы (КВ) являются основными возбудителями острых заболеваний верхних отделов дыхательных путей. Вместе с тем они могут вызывать и более тяжелые заболевания респираторного тракта, а их виды различаются по патогенности. В данной работе изучали видопринадлежность РВ и КВ в 92 клинических образцах, положительных на эти вирусы, которые были собраны на территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) установлена циркуляция всех видов РВ (РВ-А, РВ-В и РВ-С) и КВ (КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-OC43 и КВ-НКУ1). Выборочное секвенирование и филогенетический анализ фрагмента 5'-нетранслируемого района (5'-НТР) 8 изолятов риновирусов выявили 4 случая РВ-С, 3 – РВ-А и 1 – РВ-В.

Ключевые слова: риновирусы; коронавирусы; видопринадлежность; патогенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 31–36.

Lobodanov S. A.^{1,2}, Kiselev I. S.¹, Ammour Y. I.¹, Gorbalenya A. E.^{3,4}, Claas E. C. J.³, Zverev V. V.¹, Faizuloev E. B.¹

The prevalence of the human rhinoviruses and coronaviruses circulating in the Moscow region during 2007-2012

¹Federal State Budgetary Institution «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; ²Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, 111123, Moscow, Russia; ³Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands; ⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

The rhinoviruses and coronaviruses are the most common causative agents of the acute upper respiratory tract infection in humans. They include several species that vary in the pathogenicity, some causing severe respiratory tract diseases. In this work, the species prevalence of rhinoviruses and coronaviruses was studied in 92 virus-positive clinical patients that were collected at the area of the Moscow region during the period from 2007 to 2012. Using the real-time PCR the virus circulation has been established for all species common in humans, including three rhinoviruses, HRV A, HRV B, and HRV C, and four coronaviruses, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, and HCoV-NKU1. For eight patients, the identity of the rhinoviruses, including 4 cases of HRV-C, 3 cases of HRV-A, and a single case of HRV-B, was corroborated using partial sequencing of the 5 non-coding regions and phylogenetic analysis. The viruses of HRV-C, HCoV-NL63, and HCoV-OC43 were prevalent in children with severe respiratory diseases.

Key words: rhinoviruses; coronaviruses; species prevalence; pathogenicity.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 31–36. (In Russ.)

For correspondence: Sergey Lobodanov, MD, PhD; e-mail: lobodanov84@gmail.com

Received 11.03.14

Введение

Риновирусы (РВ) и коронавирусы (КВ) являются основными возбудителями так называемых простудных заболеваний (англ. common cold), для которых характерно поражение верхних отделов респираторного тракта и легкое либо среднетяжелое течение [1]. По данным Национального института аллергии и инфекционных болезней (г. Бетесда, США), эти вирусы ответственны как минимум за половину всех случаев простуды у детей и взрослых [2]. Однако анализ новых научных данных свидетельствует о все возрастающей роли этих патогенов в этиологии тяжелых заболеваний дыхательных путей вплоть до развития пневмонии [3, 4]. Следует отметить, что такие современные молекулярно-биологические методы анализа

вирусных геномов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и секвенирование, позволяют осуществлять тонкую генетическую характеристику различных возбудителей. Благодаря таким методам стало возможным дифференциальное выявление видов РВ и КВ, циркулирующих в человеческой популяции [5, 6].

Патогенными для человека являются все 3 известных вида РВ человека – *rhinovirus A* (РВ-А), *rhinovirus B* (РВ-В) и *rhinovirus C* (РВ-С) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*) [7], а также 6 видов коронавирусов человека (подсемейство *Coronavirinae*, семейство *Coronavirida*.) – *Human coronavirus 229E* (КВ-229Е), *Human coronavirus NL63* (КВ-NL63) (род *Alphacoronavirus*), *Human coronavirus OC43* (КВ-

OC43), *Human coronavirus HKU1* (KB-НКУ1), *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (KB-ТОРС), а также вирус – возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (англ. Middle East respiratory syndrome coronavirus – MERS-CoV), вид которого еще формально не определен и который условно обозначен как KB-БВРС (род *Betacoronavirus*) [7, 8]. KB-ТОРС, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (англ. SARS), и KB-БВРС являются наиболее патогенными для человека. В 2003 г., когда мир столкнулся с эпидемией атипичной пневмонии, вызванной KB-ТОРС зоонозного происхождения, было зарегистрировано около 8000 случаев заболевания, при этом летальность составила примерно 10%. Начиная с 2012 г. наблюдается ограниченная циркуляция KB-БВРС на Аравийском полуострове; инфицирование этим вирусом, который, вероятно, также зоонозного происхождения, приводит к развитию не только пневмонии, но и острой почечной недостаточности [9]. Зарегистрировано более 170 лабораторно подтвержденных случаев инфекции KB-БВРС, большинство из которых имели место в Саудовской Аравии и сопровождались крайне высокой смертностью – до 40% [10]. В связи с высокой патогенностью за циркуляцией KB-ТОРС и KB-БВРС в соответствии с рекомендациями ВОЗ установлен специальный эпидемиологический надзор, поэтому в данной работе анализ на наличие этих вирусов в клинических образцах не проводился.

Цель настоящей работы – определить видовую структуру РВ и KB, циркулирующих на территории Московского региона, и оценить их роль в развитии респираторных заболеваний различной степени тяжести. В работе проводили дифференциальное выявление 3 видов РВ человека – РВ-А, РВ-В и РВ-С и 4 видов KB человека – KB-229Е, KB-NL63, KB-НКУ1 и KB-OC43.

Материалы и методы

В работе были использованы 63 клинических образца, содержащие РНК РВ и 29 образцов, содержащих РНК KB. Эти образцы были охарактеризованы на наличие указанных вирусов с использованием лабораторного набора реагентов для дифференциального выявления 12 групп различных респираторных вирусов методом ПЦР-РВ в ходе предварительных исследований [11, 12]. Образцы от пациентов разных возрастов с симптомами ОРВИ собирали в различных лечебно-профилактических учреждениях Москвы и Московской области в период с 2007 по 2012 г. Вирусную РНК выделяли, используя набор реагентов «ZR Viral RNA Kit» («Zymo Research», США) в соответствии с рекомендациями производителя. В основе этого набора лежит модификация метода выделения нуклеиновых кислот, предложенная R. Boom и соавт. [13]. В качестве контрольных в работе использованы образцы РНК РВ серотипов 2, 8, 14, 15, 17, 20, 59, 70, 72, 86, а также РНК лабораторных штаммов KB-229Е, KB-OC43 из клинических образцов, охарактеризованных на наличие РНК KB.

Анализ вирусных геномов, подбор нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов проводили с помощью компьютерных программ FastPCR Professional v. 6.1.32. beta 3 («Primer Digital Ltd.», Финляндия) и Vector NTI Advance v. 9.0 («InforMax Inc.», США), а также интернет-программы BLAST

(«NCBI», США). Праймеры и меченные флюоресцентными красителями зонды были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия).

При постановке реакции обратной транскрипции (ОТ) 12 пмоль праймера для ОТ смешивали с 10 мкл РНК и прогревали в течение 5 мин при 65°C. Далее в 25 мкл реакционной смеси, содержащей, помимо смеси праймеров и РНК, 10 мкл «Реакционной смеси 2,5^x для проведения ПЦР-РВ», 25 ед. ревертазы MMLV (ЗАО «Синтол», Россия) в течение 30 мин при 42°C получали кДНК. Фермент инактивировали нагреванием при 95°C в течение 5 мин.

При постановке моноспецифической ПЦР-РВ (при исследовании кДНК РВ) амплификацию выполняли в 50 мкл реакционной смеси, которая содержала 10 мкл «Реакционной смеси 2,5^x для проведения ПЦР-РВ», смесь соответствующих наборов праймеров (12 пмоль каждого праймера), соответствующий флюоресцентно-меченный зонд TaqMan (5 пмоль), 2,5 ед. Hot Start Taq-ДНК-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия) и 25 мкл кДНК. Реакцию проводили в детектирующем термоциклере ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Программа ПЦР: 95°C – 120 с – 1 цикл; 95°C – 20 с, 64°C – 40 с – 45 циклов.

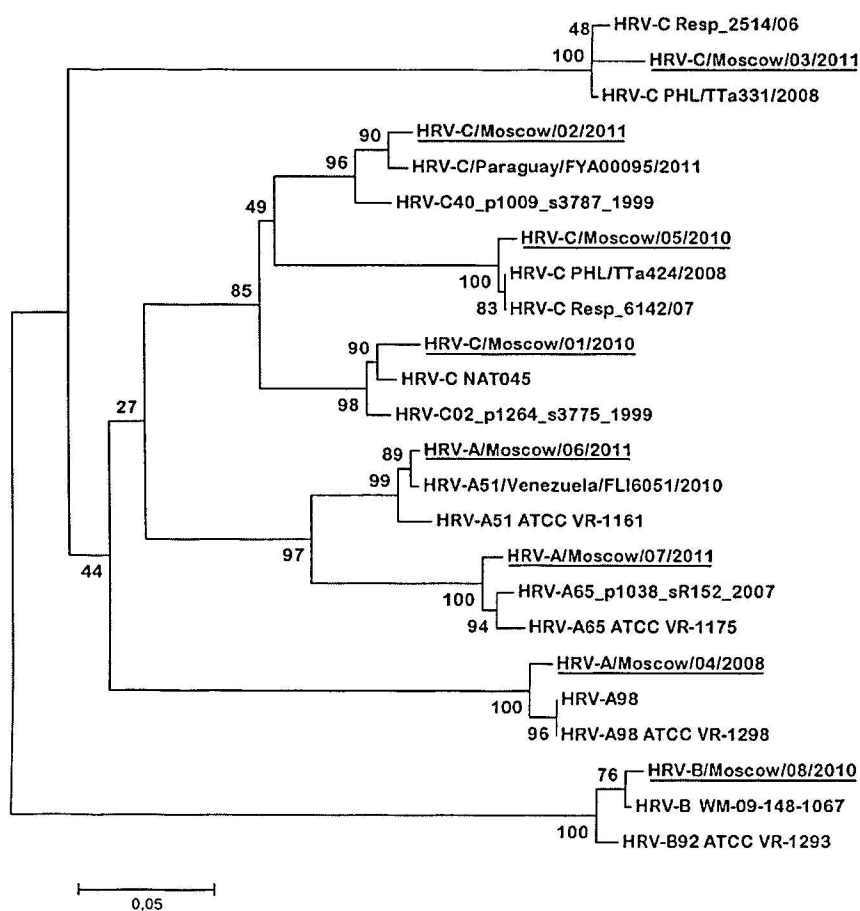
Вид KB определяли одновременно в двух пробирках в мультиплексном формате ПЦР-РВ. Первая реакционная смесь содержала набор праймеров и зондов для выявления альфа-KB – KB-229Е и KB-NL63, а вторая – для выявления бета-KB – KB-НКУ1 и KB-OC43 [6]. Температурно-временной режим амплификации был следующим: 95°C – 120 с – 1 цикл; 95°C – 20 с, 57°C – 40 с – 45 циклов. Концентрации компонентов реакционных смесей были такими же, как при выявлении РВ.

Филогенетический анализ проводили в программе Mega 5, используя метод максимального правдоподобия – ML (maximum likelihood) и 3-параметрическую эволюционную модель Тамуры. Для построения филогенетического дерева выполняли множественное выравнивание фрагмента (примерно 350 нуклеотидов) 5'-нетранслируемого района (5'-НТР) генома исследуемых и референсных штаммов РВ. Надежность внутренних узлов дерева оценивали с помощью бутстреп-анализа путем построения 500 альтернативных деревьев. В качестве референсных использовали штаммы РВ (источник – «NCBI», GenBank), имеющие наибольшее сходство с исследуемыми штаммами по результатам BLAST-анализа секвенированных последовательностей. В число использованных последовательностей вошли 8 РВ-С (коды GenBank JQ245968.1, EF077280.1, JX129428.1, JQ245963.1, AB683912.1, HM581808.1, AB683913.1, HM581888.1), 6 РВ-А (FJ445173.1, EU096084.1, JX129434.1, FJ445136.1, JQ245966.1, FJ445147.1) и 2 РВ-В (KF555347.1, FJ445169.1). Названия референсных штаммов, вид и тип (если известно) представлены на рисунке.

Результаты и обсуждение

Для дифференциального выявления 4 видов KB (KB-229Е, KB-OC43, KB-NL63 и KB-НКУ1) в исследованных образцах были использованы видоспецифические праймеры и зонды, синтезированные в соответствии с последовательностями, приведенными в статье E.R. Gaunt и соавт. [6].

Для дифференциального выявления видов РВ использовали праймеры и зонды собственного дизайна,



Филогенетический анализ участка 5'-нетранслируемой области генома РВ, выявленных в клинических образцах.

Названия РВ, выявленных в клинических образцах, подчеркнуты и включают указание вида, который установлен в ходе настоящей работы, место (Moscow) изоляции образца, его номер (от 01 до 08) и год изоляции. Для референсных последовательностей приведены полные названия штаммов РВ с указанием вида (база данных – GenBank, «NCBI»). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

направленные к 5'-концевому региону риновирусного генома. Описание праймеров и зондов, включая их видовую специфичность, приведено в табл. 1. Видоспецифические праймеры были направлены на участки вирусного генома, консервативные для представителей одного вида, но имеющие максимальное расхождение по нуклеотидной последовательности между разными видами.

Для выявления РВ-А и РВ-В кДНК получали с помощью панриновирусного праймера для ОТ (pPrt). Для получения кДНК с последующим ПЦР-анализом для выявления РВ-С использовали отдельный, «вынесенный» праймер для ОТ – PrtC. Всего было сформировано 4 реакционных смеси РВ для моноспецифической ПЦР-РВ. Первая реакционная смесь содержала панриновирусные праймеры для одновременного выявления РВ А, В и С, вторая – для выявления РВ-А, третья – РВ-В, четвертая – РВ-С.

На препаратах РНК, выделенной из лабораторных штаммов РВ-А (серотипы 2, 14, 15, 20, 59) и РВ-В (серотипы 14, 17, 70, 72, 86), была оценена аналитическая специфичность выявления РВ разных видов, а также определены оптимальные концентрации компонентов реакционных смесей и подобрана оптимальная схема

температурно-временного режима амплификации (см. «Материалы и методы»). Праймеры (и соответствующие реакционные смеси) для выявления видов РВ не показали абсолютной видовой специфичности – при анализе одного образца часто наблюдался рост флюоресцентного сигнала в 2 или 3 реакционных смесях, несмотря на жесткие температурные условия отжига праймеров – 64°C. Тем не менее эмпирически была установлена разница не менее чем в 5–7 пороговых циклах между результатами анализа одного образца видоспецифическими реакционными смесями РВ-А и РВ-В, что послужило критерием для отнесения выявленного вируса к тому или иному виду РВ. Из-за отсутствия лабораторных штаммов РВ-С, который не размножается в культуре клеток, проверить аналитическую специфичность соответствующей смеси не представлялось возможным. Таким образом, на этом этапе были отработаны условия дифференциального выявления видов РВ-А и РВ-В в реакции ПЦР-РВ. В случаях отсутствия или слабого сигнала в реакционных смесях РВ-А и РВ-В и наличия сигнала в смеси РВ-С предполагали видовую принадлежность вируса к РВ-С.

Для изучения видовой разнообразия РВ и КВ, циркулирующих в Московском регионе, из лабораторного банка клинических образцов, были отобраны образцы, в которых методом ПЦР-РВ была выявлена РНК РВ или КВ. Образцы со смешанной инфекцией, содержащие РНК РВ и/или КВ, также включали в исследование. Из образцов выделяли РНК и анализировали в реакции ПЦР-РВ, интегрированной с ОТ. Всего было проанализировано 63 образца, содержащие РВ и 29 образцов – КВ.

Из 29 образцов, содержащих РНК КВ, в 3 был идентифицирован КВ-229Е, в 9 – КВ-NL63, в 7 – КВ-НКУ1 и в 10 – КВ-ОС43. При анализе коронавирусной панели образцов не было получено спорных результатов – все образцы в результате ПЦР-анализа однозначно соотносены с видом. Не наблюдалось роста флюоресцентного сигнала больше чем по одному из каналов из четырех возможных.

В отношении РВ не было получено столь однозначно интерпретируемых результатов – РВ-А был выявлен в 32 образцах, РВ-В – в 4, РВ-С предположительно присутствовал в 21 образце. В 6 образцах вид РВ установить не удалось в связи с крайне малым содержанием вирусной РНК в образце (пороговый цикл при анализе панриновирусной смесью составлял ≥ 38 при отсутствии сигналов в каждой из трех видоспецифических смесей). Для последующего анализа были отобраны 8 (от 01 до 08) образцов, 2 из которых (04 и 03) содержали соответственно РВ-А и РВ-С, в то вре-

Последовательности праймеров и зондов для дифференциального выявления трех видов РВ

Выявляемые виды РВ	Название праймера или зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Координаты**
РВ-А, РВ-В и РВ-С	pPf1 – прямой	TGCGTGGCTGCCTGC	425–439 ¹
	pPf2 – прямой	TGCGTGGCGGCCARC	425–439 ¹
	pPf3 – прямой	CCTGCGTGGCTGCCT	423–437 ²
	pPf4 – прямой	AGCCYGCCTGGTGC	421–434 ³
	pPr – обратный	AACACGGACACCCAAAGTAGT	609–629 ¹
	pPrt – для ОТ	CGGACACCCAAAGT	612–625 ¹
	pPz – зонд	ROX-TTAGCCRCATTCAGGGGCCG-BHQ2	517–536 ¹
РВ-А*	PfA – прямой	AGTAGACCTGGCAGATGAGG	369–390 ²
РВ-В*	PfB – прямой	AGTYTGGTCGATGAGGCT	37–392 ⁴
РВ-С	PfC – прямой	CCCTGAATGCGGCTAA	525–536 ³
	Pr1C – обратный	GCTTCAACAGTTGGTGACAT	912–931 ⁵
	Pr2C – обратный	GCTTCAATTGAAGGGGACAT	912–931 ³
	Pr3C – обратный	GCCTCAATTGAGGGAGACAT	912–931 ⁶
	Pr4C – обратный	CAAGCCTCTATACTTGGACTCAT	912–934 ⁷
	PzC – зонд	ROX-CACGGACACCCAAAGTAGTYGGT-BHQ2	605–627 ³
	PrtC – для ОТ	GTAATTTGYTTAAGCCTATC	945–964 ⁵

* – В качестве праймеров для ОТ, обратных праймеров и зондов в смесях для выявления РВ-А и РВ-В применяли олигонуклеотиды pPrt, pPr и pPz соответственно, а прямые праймеры PfA и PfB являлись видоспецифическими;

** координаты приведены в соответствии со следующими последовательностями из базы GenBank: ¹ – DQ473495, ² – FJ445146, ³ – EF582387, ⁴ – FJ445161, ⁵ – EF582385, ⁶ – GQ323774, ⁷ – EU840952.

мя как видовая принадлежность вируса в остальных 6 образцах оставалась не установленной; 5 из них содержали предположительно РВ-С, а в одном из образцов вирус не был отнесен ни к одному из видов.

Для однозначного установления вида РВ в этих образцах было проведено секвенирование участка 5'-НТР генома вируса. С использованием универсальных праймеров были получены ПЦР-продукты размером 424 пар нуклеотидов (п.н.) (координаты 214–637 относительно последовательности GenBank DQ473495), захватывающие более половины 5'-НТР риновирусного генома. Секвенирование и последующий филогенетический анализ (см. рисунок) выявили высокую степень сходства и надежную кластеризацию (поддержка внутренних ветвей дерева в 96–100% пермутаций) между всеми исследуемыми вирусами и референсными штаммами, что позволило уверенно определить видовую принадлежность исследуемых вирусов (см. рисунок). В результате этого анализа было выявлено два расхождения видоопределения, полученного с помощью ПЦР: 2 образца, предположительно отнесенные по данным ПЦР к РВ-С, оказались РВ-А (образцы 06 и 07). Неидентифицированный в ПЦР образец по результатам секвенирования содержал РВ-В (образец 08). Для всех остальных образцов вид вируса подтвердился. Последовательности фрагментов геномов 8 изолятов РВ, определенные в настоящей работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами KJ490930–KJ490937.

Филогенетический анализ участка 5'-нетранслируемой области генома РВ, выявленных в клинических образцах.

Названия РВ, выявленных в клинических образцах, подчеркнуты и включают указание вида, который установлен в ходе настоящей работы, место (Moscow) изоляции образца, его номер (от 01 до 08) и год изо-

ляции. Для референсных последовательностей приведены полные названия штаммов РВ с указанием вида (база данных – GenBank, «NCBI»). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

В целом, как уже отмечалось, примененный нами подход к определению вида РВ в реакциях ОТ и ПЦР-РВ не показал абсолютной специфичности. Получена высокая доля сложно интерпретируемых результатов, особенно в случаях, когда предполагалось наличие РВ-С. Поэтому был предложен следующий общий подход к определению вида РВ в клинических образцах: на первом этапе образцы анализируют в ПЦР-РВ с видоспецифическими праймерами, а в случае спорного результата на втором этапе проводят частичное секвенирование 5'-НТР генома РВ с последующим филогенетическим анализом. Таким образом, задача заменить общепринятый подход к определению вида РВ методом секвенирования на менее трудоемкий и более производительный метод ПЦР-РВ решена в нашей работе лишь частично.

Подход к дифференциальному выявлению РВ, основанный на секвенировании и филогенетическом анализе фрагмента 5'-НТР генома РВ размером 260 или 310 п.н., предлагают также W.M. Lee и соавт. [14] и D. Kiang и соавт. [15]. В указанных работах обоснована возможность даже более тонкой генетической характеристики – определения типа РВ-А и РВ-В и выделения отдельной ветви РВ-С. По данным D. Kiang и соавт., РВ имеют значительно меньшую частоту рекомбинаций в 5'-НТР генома, чем энтеровирусы, а результаты генотипирования на основании 5'-НТР генома в высокой степени коррелируют с данными общепринятого VP4-VP2-анализа [16]. Так, результаты идентификации генотипа 71 клинического изолята РВ путем анализа 5'-НТР и VP4-VP2 совпали на 99% [15]. Однако эти исследования

Таблица 2

Распределение видов риновирусов среди амбулаторных и стационарных пациентов

Категория пациентов	Число случаев риновирусной моноинфекции (в том числе у детей в возрасте от 4 мес до 3 лет)				
	РВ-А	РВ-В	предположительно РВ-С	вид не определен	Всего
Стационарные	6 (3)	1 (0)	7 (7)	2 (1)	16 (11)
Амбулаторные	22 (16)	3 (2)	7(2)	4 (3)	36 (23)
Итого...	28 (19)	4 (2)	14 (9)	6 (4)	52 (34)

Таблица 3

Распределение видов коронавируса среди амбулаторных и стационарных пациентов

Категория пациентов	Число случаев коронавирусной моноинфекции				
	КВ-229Е	КВ-NL63	КВ-НКУ1	КВ-ОС43	Всего
Стационарные	0	7	0	6	13
Амбулаторные	3	0	6	3	12
Итого...	3	7	6	9	25

не включали РВ-С и нуждаются в подтверждении с использованием расширенной выборки.

Далее была проведена клиническая оценка роли разных видов РВ и КВ в этиологии ОРВИ различной степени тяжести. Показателем тяжелой формы заболевания служил факт госпитализации больного (стационарные пациенты), тогда как на дому проходили лечение преимущественно пациенты с легкой или среднетяжелой формой (амбулаторные пациенты). Из общего числа образцов были выделены случаи смешанной инфекции, в том числе 4 случая сочетания КВ с другим респираторным вирусом и 11 подобных случаев с РВ. Отмечены сочетания РВ и КВ как друг с другом, так и с другими респираторными вирусами – бокавирусами, вирусом гриппа А, аденовирусами, вирусами парагриппа 1-го и 3-го типа. Интересно отметить, что в подавляющем большинстве случаев (14 из 15) микст-инфекция была выявлена у пациентов, проходивших лечение в стационаре, что скорее всего свидетельствует о внутрибольничном заражении одним из вирусов. В случаях выявления РВ и КВ в составе смешанной инфекции роль этих вирусов в этиологии заболеваний представляется менее определенной, чем в случаях моноинфекции, поскольку невозможно определить, какой из выявленных вирусов вызвал первичную инфекцию и какой из них сыграл решающую роль в патогенезе заболевания. Поэтому в этом разделе работ учитывались только случаи моноинфекции, т. е. образцы, в которых выявлен только 1 вид РНК – РВ или КВ.

Всего выявлено 77 случаев ОРВИ, сопровождавшихся риновирусной ($n = 52$) или коронавирусной ($n = 25$) моноинфекцией, из которых на РВ-инфекцию приходилось 16 случаев госпитализации (31%), а на КВ-инфекцию – 13 (52%). Распределение видов РВ и КВ в образцах от групп амбулаторных и стационарных пациентов с разделением на взрослых и детей представлено в табл. 2 и 3.

Было установлено, что на территории РФ циркулируют все известные виды РВ человека – РВ-А, РВ-В и РВ-С. В общей структуре РВ, циркулировавших на

территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г., преобладал РВ-А (54% от всех исследованных образцов), доля случаев, ассоциированных предположительно с РВ-С, составила 30%, а РВ-В – 6%. Показано, что большая доля госпитализированных пациентов с РВ-инфекцией была выявлена в группе детей с РВ-С-инфекцией (из 9 детей с РВ-С 7 проходили лечение в стационаре). Следует отметить, что все госпитализированные больные, у которых был идентифицирован РВ-С, являлись детьми в возрасте от 4 мес до 3 лет.

Установлено, что на территории РФ циркулируют 4 вида КВ – КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-ОС43 и КВ-НКУ1. Все случаи тяжелого течения КВ-инфекции, потребовавшие госпитализации больного, связаны с инфицированием детей (1–5 лет) КВ-NL63 и КВ-ОС43. Все пациенты, лечившиеся амбулаторно, были взрослыми (старше 16 лет); у них были выявлены КВ-НКУ1, КВ-ОС43 и КВ-229Е. При этом следует отметить, что 3 амбулаторных пациента, у которых был выявлен КВ-ОС43, являлись волонтерами из числа сотрудников НИИВС им И.И. Мечникова и, по данным анамнеза, перенесли заболевание достаточно тяжело.

Полученные нами результаты были сопоставлены с опубликованными данными по проблеме. В работе J.E. Linder и соавт. показано, что РВ-С ассоциированы с возникновением более тяжелых заболеваний дыхательной системы по сравнению с РВ видов А и В [17]. Кроме того, предполагается, что РВ-С вызывают более серьезные приступы бронхиальной астмы у детей, зачастую требующие лечения в условиях стационара, по сравнению с другими видами РВ и другими респираторными вирусами [18]. Различия в патогенности и тропности к разным отделам респираторного тракта наблюдают и у различных видов КВ. Так, КВ-NL63, по данным S. Abdul-Rasool и В.С. Filding, чаще, чем другие виды КВ, приводит к развитию крупа у детей [19]. E.R. Gaunt и соавт. показали, что среди пациентов с моноинфекцией КВ-NL63 и КВ-ОС43, так и с коинфекцией с другим респираторным вирусом значительно преобладали случаи, сопровождавшиеся поражением нижних отделов дыхательных путей [6]. Высокая доля (70%) случаев коронавирусной инфекции у детей (как моно- так и смешанной) с поражением нижних отделов респираторного тракта и госпитализацией также отмечена в работе M. Jevšnik и соавт. [20]. Полученные нами результаты не противоречат приведенным выше данным, но ввиду небольшого размера выборки не позволяют делать серьезные выводы о различиях в патогенности различных видов РВ и КВ.

Выводы

1. Установлено, что на территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г. циркулировали все виды РВ (РВ-А, РВ-В и РВ-С) и КВ (КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-ОС43 и КВ-НКУ1).

2. Определена последовательность участка 5'-НТР генома у РВ из 8 образцов.

3. Отдельные виды РВ и КВ с высокой частотой обнаруживали у детей с тяжелыми респираторными заболеваниями. У 78% детей с РВ-С-инфекцией наблюдалось тяжелое течение заболевания, потребовавшего госпитализации, а в группе детей, у которых выявили КВ-ОС43 и КВ-NL63, лечение в стационаре проходили все 100%.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН А.А. Никоновой и А.С. Оксаничу за помощь в выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Turner R.B. The common cold. In: Mandell G., Bennett J., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*: Volume 1. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010: 809–14.
- Available at: <http://www.niaid.nih.gov/topics/commonCold/Pages/cause.aspx>.
- García-García M.L., Calvo C., Pozo F., Villadangos P.A., Pérez-Breña P., Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2012; 31(8): 808–13.
- Fielding B.C. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol.* 2011; 6(2): 153–9.
- Lee W.M., Lemanske R.F.Jr., Evans M.D., Vang F., Pappas T., Gangnon R. et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(9): 886–91.
- Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63 and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7.
- Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7790–2.
- Eckerle I., Müller M.A., Kallies S., Gotthardt D.N., Drosten C. In vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol. J.* 2013; 10: 359.
- World Health Organization. Global alert and response. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 27 December 2013. Available at: www.who.int/csr/don/2013_12_27/en/index.html (accessed 9 January 2014).
- Лободанов С.А. Эффективность этиологической диагностики ОРВИ методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2013.
- Файзулов Е.Б., Лободанов С.А., Никонova А.А., Каира А.Н., Полухина Г.М., Трушакoва С.В. и др. Дифференциальная диагностика ОРВИ методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; 1: 12–8.
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
- Lee W.M., Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T. et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One.* 2007; 2(10): e966.
- Kiang D., Kalra I, Yagi S., Louie J.K., Boushey H., Boothby J. et al. Assay for 5'-noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3736–45.
- Savolainen C., Blomqvist S., Mulders M.N., Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 2): 333–40.
- Linder J.E., Kraft D.C., Mohamed Y., Lu Z., Heil L., Tollefson S. et al. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 69–77.
- Bizzintino J., Lee W.M., Laing I.A., Vang F., Pappas T., Zhang G. et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir. J.* 2011; 37(5): 1037–42.
- Abdul-Rasool S., Fielding B.C. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* 2010; 4: 76–84.
- Jevšnik M, Uršič T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365.

REFERENCES

- Turner R.B. The common cold. In: Mandell G., Bennett J., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*: Volume 1. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010: 809–14.
- Available at: <http://www.niaid.nih.gov/topics/commonCold/Pages/cause.aspx>.
- García-García M.L., Calvo C., Pozo F., Villadangos P.A., Pérez-Breña P., Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2012; 31(8): 808–13.
- Fielding B.C. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol.* 2011; 6(2): 153–9.
- Lee W.M., Lemanske R.F.Jr., Evans M.D., Vang F., Pappas T., Gangnon R. et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(9): 886–91.
- Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63 and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7.
- Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7790–2.
- Eckerle I., Müller M.A., Kallies S., Gotthardt D.N., Drosten C. In vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol. J.* 2013; 10: 359.
- World Health Organization. Global alert and response. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 27 December 2013. Available at: www.who.int/csr/don/2013_12_27/en/index.html (accessed 9 January 2014).
- Lobodanov S.A. Efficacy etiologic diagnosis ARI detection by PCR real-time: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
- Faizuloev E.B., Lobodanov S.A., Nikonova A.A., Kaira A.N., Poluhina G.M., Trushakova S.V. et al. Differential diagnosis of respiratory viral infections by multiplex real-time PCR. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika.* 2012; 1: 12–8. (in Russian)
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
- Lee W.M., Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T. et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One.* 2007; 2(10): e966.
- Kiang D., Kalra I, Yagi S., Louie J.K., Boushey H., Boothby J. et al. Assay for 5'-noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3736–45.
- Savolainen C., Blomqvist S., Mulders M.N., Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 2): 333–40.
- Linder J.E., Kraft D.C., Mohamed Y., Lu Z., Heil L., Tollefson S. et al. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 69–77.
- Bizzintino J., Lee W.M., Laing I.A., Vang F., Pappas T., Zhang G. et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir. J.* 2011; 37(5): 1037–42.
- Abdul-Rasool S., Fielding B.C. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* 2010; 4: 76–84.
- Jevšnik M, Uršič T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365.

Получена 11.03.14